



*110
JL*
PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Katsuhide MIYAKE et al.

Appln. No.: 09/900,038

Group Art Unit: 1652

Filed: July 9, 2001

Examiner: Slobodyansky, Elizabeth, PhD

For: β 1,3-GALACTOSYLTRANSFERASE AND DNA ENCODING THE SAME

DECLARATION

Assistant Commissioner for Patents

Washington, D.C. 20231

Sir/Madam:

I, Eiichi Kobayashi, do declare and state that:

I graduated from the University of Tokyo, Faculty of Agriculture, Department in Agricultural Chemistry, having received a Master's Degree of Agriculture in March, 1992.

I understand the Japanese and English languages. Attachment A is a copy of Japanese Patent Application No. 2001-392, filed January 5, 2001, the claim to the priority date of which application was made in the above-identified U.S. patent application, and Attachment B is an accurate English translation made by me of Attachment A.

I declare further that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Date: February 3, 2003

Name: Eiichi Kobayashi

Eiichi Kobayashi

B

[Document] Patent Application
[Reference No.] H12-211A4
[Special item] Patent application based on Patent Act 30, Article 1
[Date of filing] January 5, 2001
[Attention to] Commissioner, Patent Office
[ITC] C12P 19/00
[Inventor]
 [Address] c/o Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi,
 Aichi
 [Name] Katsuhide MIYAKE
[Inventor]
 [Address] c/o Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi,
 Aichi
 [Name] Masaki WATANABE
[Inventor]
 [Address] c/o Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi,
 Aichi
 [Name] Shinji IIJIMA
[Applicant for Patent]
 [Identification No.] 000001029
 [Name or Appellation] Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
 [Representative] Tadashi Hirata
[Identification of Fees]
 [Prepayment Account No.] 008187
 [Amount of Fees Payable] 21000
[List of Documents to Be Submitted]
 [Document] Specification 1
 [Document] Drawing 1
 [Document] Abstract 1
[Request of Proof] Yes

(Document name)

(Title of the invention)

β 1,3-GALACTOSYLTRANSFERASE AND DNA ENCODING THE SAME

(Scope of the claims)

(Claim 1) A protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from a microorganism having an activity of transferring galactose to N-acetylglucosamine with β 1,3-linkage.

(Claim 2) The protein according to claim 1, wherein the microorganism belongs to the genus *Streptococcus*.

(Claim 3) The protein according to claim 2, wherein the microorganism is *Streptococcus agalactiae*.

(Claim 4) A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1.

(Claim 5) A protein comprising an amino acid sequence in which at least one amino acid is deleted, replaced, inserted or added in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, said protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity.

(Claim 6) A DNA encoding the protein of any one of claims 1 to 5.

(Claim 7) A DNA comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2.

(Claim 8) A DNA which hybridizes with a DNA comprising the complementary sequence to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 under stringent conditions, and encodes a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity.

(Claim 9) A recombinant DNA comprising the DNA of any one of claims 6 to 8 and a vector.

(Claim 10) A transformant obtained by introducing the recombinant DNA of claim 9 into a host cell.

(Claim 11) The transformant according to claim 10, wherein the host cell is a microorganism.

(Claim 12) The transformant according to claim 11, wherein the microorganism belongs to the genus *Escherichia*.

(Claim 13) The transformant according to claim 12, wherein the microorganism belonging to the genus *Escherichia* is *Escherichia coli*.

(Claim 14) A method for producing a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity, comprising culturing the transformant of any one of claims 10 to 13 in a medium to produce and accumulate a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity in the culture, and recovering the protein from the culture.

(Claim 15) A method for producing a galactose-containing carbohydrate, comprising selecting, as an enzyme source, a culture of the transformant of any one of claims 10 to 13 or a treated product of the culture, allowing the

enzyme source, uridine-5'-diphosphogalactose and an acceptor carbohydrate to be present in an aqueous medium to produce and accumulate the galactose-containing carbohydrate in the aqueous medium, and recovering the galactose-containing carbohydrate from the aqueous medium.

(Claim 16) The method according to claim 15, wherein the treated product of the culture is selected from the group consisting of a concentrated product of the culture, a dried product of the culture, cells obtained by centrifuging the culture, a dried product of the cells, a freeze-dried product of the cells, a surfactant-treated product of the cells, an ultrasonic-treated product of the cells, a mechanically disrupted product of the cells, a solvent-treated product of the cells, an enzyme-treated product of the cells, a protein fraction of the cells, an immobilized product of the cells and an enzyme preparation obtained by extracting from the cells.

(Claim 17) The method according to claim 15, wherein the acceptor carbohydrate is a carbohydrate having *N*-acetylglucosamine at its non-reducing terminal.

(Claim 18) The method according to claim 15, wherein the acceptor carbohydrate is selected from the group consisting of *N*-acetylglucosamine and lacto-*N*-triose II.

(Claim 19) The method according to claim 15, wherein the galactose-containing carbohydrate is selected

from the group consisting of lacto-*N*-biose and lacto-*N*-tetraose.

(Detailed description of the invention)

(0001)

(Technical field to which the invention belongs)

The present invention relates to a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity, a DNA encoding the protein, a recombinant DNA containing the DNA, a transformant containing the recombinant DNA, a method for producing a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity using the transformant, and a method for producing a galactose-containing carbohydrate using the transformant.

(0002)

(Background art)

Regarding β 1,3-galactosyltransferase genes, the genes derived from higher animal (*J. Biol. Chem.*, 273: 58 (1998), *J. Biol. Chem.*, 273: 12770 (1998), *J. Biol. Chem.*, 274: 12499 (1999)) have been obtained. However, since it is generally difficult to express the genes derived from higher-animal as active proteins in microorganisms, a β 1,3-galactosyltransferase gene derived from higher-animal has not been expressed as an active protein in a microorganism such as *Escherichia coli* or the like.

(0003)

On the other hand, in microorganisms, there is a report stating that a β 1,3-galactosyltransferase gene was

obtained from *Campylobacter jejuni* and the gene was expressed in *Escherichia coli*. However, although this enzyme has an activity of transferring galactose to *N*-acetylgalactosamine, there is no report about the activity of transferring galactose to *N*-acetylglucosamine (*J. Biol. Chem.*, 274: 12499 (1999)).

(0004)

Human milk abundantly contains galactose-containing carbohydrates, lacto-*N*-tetraose being one of the main components (*Acta Paediatr.*, 82: 903 (1993), *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 30: 181 (2000)). Since it is known that lacto-*N*-tetraose and lacto-*N*-neotetraose, which are the galactose-containing carbohydrates, are recognized by *Pseudomonas aeruginosa* (*Infect. Immun.*, 59: 700 (1991)), the galactose-containing carbohydrates are considered to be strong candidates for safe antiinfection drugs which can prevent human body from infection with *Pseudomonas aeruginosa*.

(0005)

Regarding production of a galactose-containing carbohydrate such as lacto-*N*-tetraose or the like, both the methods of extraction from human milk and chemical synthesis are known but such methods have problems in terms of cost and productivity, so that its industrial production method has not yet been established.

(0006)

(Problems to be solved by the invention)

An object of the present invention is to provide a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity, a DNA encoding the protein, a method for producing a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity using a transformant containing the DNA, and a method for producing a galactose-containing carbohydrate using the protein.

(0007)

(Means to solve the problems)

In order to solve the above problems, the present inventors have conducted intensive studies and found a novel β 1,3-galactosyltransferase, among enzymes concerning capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus agalactiae*, and have isolated the DNA encoding such enzyme.

(0008)

Specifically, the present invention relates to the following (1) to (19):

(1) A protein having a β 1,3-galactosyltransferase

activity derived from a microorganism having an activity of transferring galactose to *N*-acetylglucosamine with β 1,3-linkage.

(2) The protein according to (1), wherein the microorganism belongs to the genus *Streptococcus*.

(3) The protein according to (2), wherein the microorganism is *Streptococcus agalactiae*.

(4) A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1.

(5) A protein comprising an amino acid sequence in which at least one amino acid is deleted, replaced, inserted or added in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, said protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity.

(6) A DNA encoding the protein of any one of (1) to (5).

(7) A DNA comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2.

(8) A DNA which hybridizes with a DNA comprising the complementary sequence to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 under stringent conditions, and encodes a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity.

(9) A recombinant DNA comprising the DNA of any one of (6) to (8) and a vector.

(10) A transformant obtained by introducing the recombinant DNA of (9) into a host cell.

(11) The transformant according to (10), wherein the host cell is a microorganism.

(12) The transformant according to (11), wherein the microorganism belongs to the genus *Escherichia*.

(13) The transformant according to (12), wherein the microorganism belonging to the genus *Escherichia* is *Escherichia coli*.

(14) A method for producing a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity, comprising culturing the transformant of any one of (10) to (13) in a medium to produce and accumulate a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity in the culture, and recovering the protein from the culture.

(15) A method for producing a galactose-containing carbohydrate, comprising selecting, as an enzyme source, a culture of the transformant of any one of (10) to (13) or a treated product of the culture, allowing the enzyme source, uridine-5'-diphosphogalactose and an acceptor carbohydrate to be present in an aqueous medium to produce and accumulate the galactose-containing carbohydrate in the aqueous medium, and recovering the galactose-containing carbohydrate from the aqueous medium.

(16) The method according to (15), wherein the treated product of the culture is selected from the group consisting of a concentrated product of the culture, a dried product of the culture, cells obtained by centrifuging the culture, a dried product of the cells, a freeze-dried product of the cells, a surfactant-treated product of the cells, an ultrasonic-treated product of the cells, a mechanically disrupted product of the cells, a solvent-treated product of the cells, an enzyme-treated product of the cells, a protein fraction of the cells, an

immobilized product of the cells and an enzyme preparation obtained by extracting from the cells.

(17) The method according to (15), wherein the acceptor carbohydrate is a carbohydrate having *N*-acetylglucosamine at its non-reducing terminal.

(18) The method according to (15), wherein the acceptor carbohydrate is selected from the group consisting of *N*-acetylglucosamine and lacto-*N*-triose II.

(19) The method according to (15), wherein the galactose-containing carbohydrate is selected from the group consisting of lacto-*N*-biose and lacto-*N*-tetraose.

(0009)

(Embodiments for carrying out the invention)

The protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity of the present invention is a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from a microorganism which uses, as a substrate, an acceptor carbohydrate having *N*-acetylglucosamine (hereinafter referred to as "GlcNAc") on its non-reducing terminal. For example, preferred is a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from a microorganism belonging to the genus *Streptococcus*, and more preferred is a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from *Streptococcus agalactiae*.

(0010)

Specifically, the protein of the present invention includes a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, and a protein comprising an amino acid sequence in which at most 20 amino acids are deleted, replaced, inserted or added in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 and having a β 1,3-galactosyltransferase activity.

(0011)

The modified protein can readily be obtained using a method for introducing site-directed mutation(s) described in, for example, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (hereinafter referred to as "*Molecular Cloning, 2nd ed.*"), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987-1997) (hereinafter referred to as "*Current Protocols in Molecular Biology*"), *Nuc. Acids. Res.*, 10: 6487 (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6409 (1982), *Gene*, 34: 315 (1985), *Nuc. Acids. Res.*, 13: 4431 (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 488 (1985) and the like. For example, the protein can be obtained by introducing mutation(s) to DNA encoding a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2.

(0012)

The number of the amino acids which are deleted, replaced, inserted or added is not particularly limited;

however, it is usually 1 to 20, preferably 1 to 10, and more preferably 1 to 5, amino acids.

Also, in order to have the β 1,3-galactosyltransferase activity of the protein of the present invention, it has preferably at least 50% or more, preferably 60% or more, still more preferably 80% or more, most preferably 95% or more, of identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1.

(0013)

The DNA of the present invention includes a DNA encoding the protein of the present invention.

Specific examples include a DNA encoding a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, a DNA comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2, and a DNA which hybridizes with a DNA comprising the complementary sequence to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 under stringent conditions and encodes a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity.

(0014)

The DNA which hybridizes under stringent conditions is a DNA obtained by colony hybridization, plaque hybridization, Southern hybridization or the like using, as a probe, the DNA comprising the complementary sequence to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2. Specific examples include a DNA which can be identified by

carrying out hybridization at 65°C in the presence of 0.7-1.0 M NaCl using a filter on which a DNA prepared from colonies or plaques is immobilized, and then washing the filter with 0.1 \times to 2 \times SSC solution (the composition of 1 \times SSC contains 150 mM sodium chloride and 15 mM sodium citrate) at 65°C.

(0015)

The hybridization can be carried out in accordance with a known method described in, for example, *Molecular Cloning*, 2nd ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, *DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach*, 2nd ed., Oxford University (1995) or the like. Specific examples of the DNA which can be hybridized include a DNA having an identity of 60% or more, preferably 80% or more, and more preferably 95% or more, with the complementary sequence to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 when calculated using above BLAST or the like.

(0016)

The transformant which produces the protein of the present invention having a β 1,3-galactosyltransferase activity can be obtained, e.g., by preparing a recombinant DNA through ligation of the DNA of the present invention to a vector DNA in accordance with the method described in *Molecular Cloning*, 2nd ed., and then transforming a host cell with the recombinant DNA in accordance with the method described in *Molecular Cloning*, 2nd ed.

(0017)

The present invention is explained below in more detail.

(1) Preparation of the DNA of the present invention

The DNA of the present invention is desirably prepared from a microorganism belonging to the genus *Streptococcus*. Examples of the microorganism belonging to the genus *Streptococcus* include *Streptococcus agalactiae*, such as *Streptococcus agalactiae* Type Ib and the like.

(0018)

The microorganism belonging to the genus *Streptococcus* is cultured by a known method (for example, the method described in *J. Bacteriol.*, 181: 5176 (1999)).

After culturing, chromosomal DNA of the microorganism is isolated and purified by a known method (for example, method described in *Current Protocols in Molecular Biology*).

A fragment containing the DNA of the present invention can be obtained by a hybridization method, PCR or the like using a synthetic DNA designed based on a nucleotide sequence among the capsular polysaccharide biosynthesis genes of *Streptococcus agalactiae* Type III or Type Ia.

(0019)

The vector to which the DNA is ligated may be any vector, such as a phage vector, a plasmid vector or the

like, so long as it can replicate autonomously in *Escherichia coli* K12. Specific examples include ZAP Express (manufactured by Stratagene, *Strategies*, 5: 58 (1992)), pBluescript II SK(+) (manufactured by Stratagene, *Nucleic Acids Res.*, 17: 9494 (1989)), λ zap II (manufactured by Stratagene), λ gt10 and λ gt11 (*DNA Cloning, A Practical Approach*, 1: 49 (1985)), λ Triplex (manufactured by Clontech), λ ExCell (manufactured by Amersham Pharmacia Biotech), pUC18 (*Gene*, 33: 103 (1985)) and the like.

(0020)

Any microorganism belonging to *Escherichia coli* can be used for the host of the recombinant DNA obtained by ligating the DNA of the present invention to the above vector, so long as it is a microorganism belonging to *Escherichia coli*. Specific examples include *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (manufactured by Stratagene, *Strategies*, 5: 81 (1992)), *Escherichia coli* C600 (*Genetics*, 39: 440 (1954)), *Escherichia coli* Y1088 (*Science*, 222: 778 (1983)), *Escherichia coli* Y1090 (*Science*, 222: 778 (1983)), *Escherichia coli* NM522 (*J. Mol. Biol.*, 166: 1 (1983)), *Escherichia coli* K802 (*J. Mol. Biol.*, 16: 118 (1966)), *Escherichia coli* JM105 (*Gene*, 38: 275 (1985)) and the like.

(0021)

Any method can be used in the method for introducing the recombinant DNA, so long as it is a method for introducing DNA into the selected host cell. Examples

include a method using a calcium ion (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110 (1972)), a protoplast (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 248394/88), an electroporation (*Nucleic Acid Res.*, 16: 6127 (1988)) and the like.

(0022)

The nucleotide sequence of the DNA of the present invention contained in the recombinant DNA can be determined by extracting the recombinant DNA from the thus obtained transformant. For the determination of the nucleotide sequence, a conventional method, such as the dideoxy method (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463 (1977)) or an apparatus for nucleotide sequence analysis, such as DNA Sequencer 373A (manufactured by Perkin-Elmer) or the like, can be used.

(0023)

The DNA of interest can also be prepared by chemical synthesis based on the thus determined nucleotide sequence using, for example, DNA Synthesizer 8905 Type manufactured by Perceptive Biosystems or the like.

Examples of transformant containing the thus obtained recombinant DNA include *Escherichia coli* JM109/pBBPJ containing a plasmid DNA having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2.

(2) Preparation of the protein of the present invention.

The protein of the present invention can be produced by expressing the DNA of the present invention obtained by the method of (1) in a host cell, for example, as shown below, using a method described in *Molecular Cloning*, 2nd ed., *Current Protocols in Molecular Biology* or the like.

(0024)

When the DNA of the present invention is used, a DNA fragment of a suitable length containing a portion which encodes the protein of the present invention can be prepared, if necessary. In addition, productivity of the protein can be improved by substituting a nucleotide of the protein-coding portion of the nucleotide sequence so that it has the most suitable codons for the expression in the host.

The transformant which expresses the DNA of the present invention can be obtained by inserting the DNA into a downstream of the promoter of a suitable expression vector to thereby prepare a recombinant DNA, and introducing the recombinant DNA into a host cell suitable for the expression vector.

(0025)

Any bacteria, yeasts, animal cells, insect cells, plant cells, and the like can be used as the host cell so long as it can express the gene of interest.

Examples of the expression vector include those which can replicate autonomously in the above-described host cell or can be integrated into chromosome and have a promoter at such a position that the DNA of the present invention can be transcribed.

(0026)

When a procaryote cell, such as a bacterium or the like, is used as the host cell, it is preferred that the recombinant DNA containing the DNA of the present invention can replicate autonomously in the bacterium. It is also preferred that the recombinant vector contains a promoter, a ribosome binding sequence, the DNA of the present invention and a transcription termination sequence. A gene regulating the promoter may also be desirably contained therewith in operable combination.

(0027)

Examples of the expression vector include pHelix1 (manufactured by Roche Diagnostics), pKK223-3 (manufactured by Amersham Pharmacia Biotech), pSE280 (manufactured by Invitrogen), pGEMEX-1 (manufactured by Promega), pQE-8 (manufactured by QIAGEN), pET-3 (manufactured by Novagen), pKYP10 (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 110600/83), pKYP200 (*Agric. Biol. Chem.*, 48: 669 (1984)), pLSA1 (*Agric. Biol. Chem.*, 53: 277 (1989)), pGEL1 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4306 (1985)), pBluescript II SK(+) (manufactured by Stratagene), pTrs30 (prepared from

Escherichia coli JM109/pTrS30 (FERM BP-5407)), pTrs32 (prepared from *Escherichia coli* JM109/pTrS32 (FERM BP-5408)), pPAC31 (WO 98/12343), pUC19 (Gene, 33: 103 (1985)), pSTV28 (manufactured by Takara Shuzo), pUC118 (manufactured by Takara Shuzo), pPA1 (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 233798/88), and the like.

(0028)

Any promoter can be used so long as it can function in the host cell. Examples include promoters derived from *Escherichia coli*, phage and the like, such as *trp* promoter (P_{trp}), *lac* promoter (P_{lac}), P_L promoter, P_R promoter, P_{SE} promoter, etc., SPO1 promoter, SPO2 promoter, penP promoter and the like. Also, artificially designed and modified promoters, such as a promoter in which two P_{trp} are linked in tandem (P_{trp}×2), tac promoter, lacT7 promoter letI promoter and the like, can be used.

(0029)

It is preferred to use a plasmid in which the space between Shine-Dalgarno sequence, which is the ribosome binding sequence, and the initiation codon is adjusted to an appropriate distance (for example, 6 to 18 base pairs).

The transcription termination sequence is not always necessary for the expression of the DNA of the present invention. However, it is preferred to provide a transcription terminating sequence just downstream of the structural gene.

(0030)

Examples of the procaryote cell include microorganisms belonging to the genera *Escherichia*, *Serratia*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* and the like. Specific examples include *Escherichia coli* XL1-Blue, *Escherichia coli* XL2-Blue, *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* MC1000, *Escherichia coli* KY3276, *Escherichia coli* W1485, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* No. 49, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* NY49, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068, *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354, *Pseudomonas* sp. D-0110, *Streptococcus agalactiae* Type Ia, *Streptococcus agalactiae* Type Ib, *Streptococcus agalactiae* Type III, *Streptococcus pneumoniae* Type 14, and the like.

(0031)

With regard to the method for the introduction of the recombinant DNA, any method for introducing DNA into the above-described host cells, such as a method using a

calcium ion (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110 (1972)), a protoplast (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 248394/88), an electroporation (*Nucleic Acids Res.*, 16: 6127 (1988)) and the like, can be used.

(0032)

When yeast is used as the host cell, examples of the expression vector include YEp13 (ATCC 37115), YEp24 (ATCC 37051), YCp50 (ATCC 37419), pHS19, pHS15, and the like.

Any promoter can be used so long as it can function in yeast. Examples include PHO5 promoter, PGK promoter, GAP promoter, ADH promoter, gal 1 promoter, gal 10 promoter, a heat shock polypeptide promoter, MFal promoter, CUP 1 promoter and the like.

(0033)

Examples of the host cell include yeast strains belonging to the genera *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Trichosporon*, *Schwanniomyces*, *Pichia*, *Candida* and the like. Specific examples include *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon pullulans*, *Schwanniomyces alluvius*, *Pichia pastoris*, *Candida utilis* and the like.

(0034)

With regard to the method for the introduction of the recombinant DNA, any method for introducing DNA into

yeast, such as an electroporation (*Methods. Enzymol.*, 194: 182 (1990)), a spheroplast method (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1929 (1978)), a lithium acetate method (*J. Bacteriol.*, 153: 163 (1983)) and the like, can be used.

(0035)

When an animal cell is used as the host cell, examples of the expression vector include pcDNAI and pcDM8 (manufactured by Funakoshi), pAGE107 (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 22979/91), pAS3-3 (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 227075/90), pcDM8 (*Nature*, 329: 840 (1987)), pcDNAI/Amp (manufactured by Invitrogen), pREP4 (manufactured by Invitrogen), pAGE103 (*J. Biochem.*, 101: 1307 (1987)), pAGE210, pAMo, pAMoA and the like.

(0036)

Any promoter can be used so long as it can function in an animal cell. Examples include a promoter of IE (immediate early) gene of cytomegalovirus (CMV), an early promoter of SV40, a metallothionein promoter, a promoter of retrovirus, a heat shock promoter, SR α promoter, and the like. Also, the enhancer of the IE gene of human CMV can be used together with the promoter.

(0037)

Examples of the host cell include mouse myeloma cell, rat myeloma cell, mouse hybridoma cell, human Namalwa cell, Namalwa KJM-1 cell, human fetal kidney cell, human

leukemia cell, African grivet kidney cell, Chinese hamster ovary (CHO) cell HST5637 (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 299/88) and the like.

(0038)

Examples of the mouse myeloma cell include SP2/0, NS0 and the like. Examples of the rat myeloma cell include YB2/0 and the like. Examples of the human fetal kidney cell include HEK293 (ATCC: CRL-1573) and the like. Examples of the human leukemia cell include BALL-1 and the like. Examples of the African grivet kidney cell include COS-1, COS-7 and the like.

The method for introduction of the recombinant DNA into animal cells is not particularly limited, so long as it is the general method for introducing DNA into animal cells, such as an electroporation (*Cytotechnology*, 3: 133 (1990)), a calcium phosphate method (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 227075/90), a lipofection (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413 (1987)), the method described in *Virology*, 52: 456 (1973) and the like.

(0039)

When an insect cell is used as the host cell, the protein can be expressed by a known method described in, for example, *Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*, W.H. Freeman and Company, New York (1992), *Molecular Biology, A Laboratory Manual, Current Protocols*

in Molecular Biology, Bio/Technology, 6: 47 (1988) or the like.

(0040)

Specifically, a transfer vector containing the DNA to make it express and baculovirus are co-transfected into an insect cell to obtain a recombinant virus in a supernatant of the culture of its insect cell, and then an insect cell is infected with the resulting recombinant virus to express the protein.

Examples of the transfer vector used in the method include pVL1392, pVL1393 and pBlueBacIII (all manufactured by Invitrogen), and the like.

(0041)

Examples of the baculovirus include *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus which infects insects of the family *Barathra* and the like.

Examples of the insect cell include *Spodoptera frugiperda* ovary cell, *Trichoplusia ni* ovary cell, *Bombyx mori* ovary-derived culturing cell and the like.

(0042)

Examples of *Spodoptera frugiperda* ovary cells include Sf9 and Sf21 (*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*) and the like. Examples of *Trichoplusia ni* ovary cells include High 5 and BTI-TN-5B1-4 (manufactured by Invitrogen) and the like. Examples of the

cell line derived from silkworm ovary cell include *Bombyx mori* N4 and the like.

The methods for co-transfected the above transfer vector and the above baculovirus for the preparation of the recombinant virus include a calcium phosphate method (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 227075/90), a lipofection (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413 (1987)), and the like.

(0043)

When a plant cell is used as the host cell, examples of expression vector include Ti plasmid, a tobacco mosaic virus vector, and the like.

Any promoter can be used so long as it can function in a plant cell. Examples include 35S promoter of cauliflower mosaic virus (CaMV), rice actin 1 promoter, and the like.

(0044)

Examples of the host cells include plant cells and the like, such as tobacco, potato, tomato, carrot, soybean, rape, alfalfa, rice, wheat, barley, and the like.

The method for introducing the recombinant DNA is not particularly limited, so long as it is the general method for introducing DNA into a plant cell, such as the *Agrobacterium* method (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 140885/84, Japanese Published Unexamined Patent Application No. 70080/85, WO 94/00977), the

electroporation (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 251887/85), the particle gun method (Patents 2606856 and 2517813), and the like.

(0045)

The gene can be expressed as a secretory protein or a fusion protein and the like in accordance with the methods described in *Molecular Cloning*, 2nd ed., in addition to direct expression.

When expressed in yeast, an animal cell or an insect cell, a glycosylated protein can be obtained.

(0046)

The protein of the present invention can be produced by culturing the thus obtained transformant of the present invention in a medium to produce and accumulate the protein in the culture, and recovering the protein from the culture.

Culturing of the transformant of the present invention in a medium is carried out according to the conventional method as used in culturing of the host.

(0047)

As a medium for culturing the transformant obtained by using, as the host, prokaryote (such as *Escherichia coli* or the like) or eukaryote (such as yeast or the like), the medium may be either a natural medium or a synthetic medium, so long as it contains a carbon source, a nitrogen source, an inorganic salt and the like which can be assimilated by

the organism and the transformant can be cultured efficiently.

Examples of the carbon source which can be assimilated by the transformant include carbohydrates (for example, glucose, fructose, sucrose, molasses containing them, starch, starch hydrolysate, etc.), organic acids (for example, acetic acid, propionic acid, etc.), alcohols (for example, ethanol, propanol, etc.), and the like.

(0048)

Examples of the nitrogen source include ammonia, various ammonium salts of inorganic acids or organic acids (for example, ammonium chloride, ammonium sulfate, ammonium acetate, ammonium phosphate, etc.), other nitrogen-containing compounds, peptone, meat extract, yeast extract, corn steep liquor, casein hydrolysate, soybean meal and soybean meal hydrolysate, various fermented cells and hydrolysates thereof, and the like.

(0049)

Examples of the inorganic salt include potassium dihydrogen phosphate, dipotassium hydrogen phosphate, magnesium phosphate, magnesium sulfate, sodium chloride, ferrous sulfate, manganese sulfate, copper sulfate, calcium carbonate, and the like.

Culturing is usually carried out under aerobic conditions by shaking culture, submerged spinner culture under aeration or the like. The culturing temperature is

preferably from 15 to 40°C, and the culturing time is generally from 5 hours to 7 days. The pH of the medium is preferably maintained at 3.0 to 9.0 during culturing. The pH can be adjusted using an inorganic or organic acid, an alkali solution, urea, calcium carbonate, ammonia, or the like.

(0050)

Also, antibiotics such as ampicillin, tetracycline, and the like, can be added to the medium during culturing, if necessary.

When a microorganism transformed with an expression vector containing an inducible promoter is cultured, an inducer can be added to the medium, if necessary. For example, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) or the like can be added to the medium when a microorganism transformed with an expression vector containing lac promoter is cultured, or indoleacrylic acid or the like can be added thereto when a microorganism transformed with an expression vector containing trp promoter is cultured.

(0051)

Examples of the medium for culturing a transformant obtained using an animal cell as the host include generally used RPMI 1640 medium (*The Journal of the American Medical Association*, 199: 519 (1967)), Eagle's MEM (*Science*, 122: 501 (1952)), DMEME (*Virology*, 8: 396 (1959)), and 199 Medium (*Proceeding of the Society for the Biological*

Medicine, 73: 1 (1950)), as well as other media to which fetal calf serum or the like has been added to the above media and the like.

(0052)

Culturing is generally carried out under conditions at pH 6 to 8 and at 30 to 40°C for 1 to 7 days in the presence of 5% CO₂, or the like.

Furthermore, if desired, antibiotics such as kanamycin, penicillin, streptomycin and the like, can be added to the medium during culturing.

Examples of the medium for culturing a transformant obtained using an insect cell as the host include generally used TNM-FH medium (manufactured by Pharmingen), Sf-900 II SFM (manufactured by Life Technologies), ExCell 400 and ExCell 405 (both manufactured by JRH Biosciences), Grace's Insect Medium (*Nature*, 195: 788 (1962)) and the like.

(0053)

Culturing is generally carried out under conditions at pH 6 to 7 and at 25 to 30°C for 1 to 5 days or the like.

Furthermore, if desired, antibiotics such as gentamicin and the like, can be added to the medium during culturing.

A transformant obtained using a plant cell as the host cell can be used as the cell or after differentiating to a plant cell or organ. Examples of the medium used in culturing of the transformant include Murashige and Skoog

(MS) medium, White medium, media to which a plant hormone, such as auxin, cytokinine, or the like has been added, and the like.

(0054)

Culturing is carried out generally at a pH 5 to 9 and at 20 to 40°C for 3 to 60 days.

Also, antibiotics such as kanamycin, hygromycin and the like, can be added to the medium during culturing, if necessary.

As described above, the protein can be produced by culturing a transformant derived from a microorganism, animal cell or plant cell containing a recombinant DNA to which a DNA encoding the protein of the present invention has been inserted according to the general culturing method to produce and accumulate the protein, and recovering the protein from the culture.

(0055)

The method for producing the protein of the present invention includes a method of intracellular expression in a host cell, a method of extracellular secretion from a host cell, or a method of production on an outer membrane of the host cell. The method can be selected by changing the host cell employed or the structure of the protein produced.

When the protein of the present invention is produced in a host cell or on an outer membrane of the host

cell, the protein can be actively secreted extracellularly according to, for example, the method of Paulson et al. (*J. Biol. Chem.*, 264: 17619 (1989)), the method of Lowe et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8227 (1989); *Genes Develop.*, 4: 1288 (1990)), or the methods described in Japanese Published Unexamined Patent Application Nos. 336963/93, 823021/94, and the like.

(0056)

Specifically, the protein of the present invention can be actively secreted extracellularly by expressing it in the form that a signal peptide has been added to the side of N-terminal of a protein containing an active site of the protein of the present invention according to the recombinant DNA technique.

(0057)

Furthermore, the amount produced can be increased using a gene amplification system, such as by use of a dihydrofolate reductase gene or the like according to the method described in Japanese Published Unexamined Patent Application No. 227075/90.

Moreover, the protein of the present invention can be produced by a transgenic animal (transgenic nonhuman animal) or plant (transgenic plant).

When the transformant is the nonhuman animal individual or plant individual, the protein of the present invention can be produced by breeding or cultivating it so

as to produce and accumulate the protein, and recovering the protein from the nonhuman animal individual or plant individual.

(0058)

Examples of the method for producing the protein of the present invention using the nonhuman animal individual include a method for producing the protein of the present invention in a nonhuman animal developed by introducing a gene according to known methods (*Am. J. Clin. Nutr.*, 63: 639S (1996), *Am. J. Clin. Nutr.*, 63: 627S (1996), *Bio/Technology*, 9: 830 (1991)).

In the nonhuman animal individual, the protein can be produced by breeding a transgenic nonhuman animal to which the DNA encoding the protein of the present invention has been introduced to produce and accumulate the protein in the animal, and recovering the protein from the animal. Examples of the production and accumulation place in the animal include milk (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 309192/88), egg and the like of the animal. Any promoter can be used, so long as it can function in the animal. Suitable examples include an α -casein promoter, a β -casein promoter, a β -lactoglobulin promoter, a whey acidic protein promoter, and the like, which are specific for mammary glandular cells.

(0059)

Examples of the method for producing the protein of the present invention using the plant individual include a method for producing the protein of the present invention by cultivating a transgenic plant to which the DNA encoding the protein of the present invention is introduced by a known method (*Tissue Culture*, 20 (1994), *Tissue Culture*, 21 (1994), *Trends in Biotechnol.*, 15: 45 (1997)) to produce and accumulate the protein in the plant, and recovering the protein from the plant.

(0060)

The protein produced by the transformant of the present invention can be isolated and purified using the general method for isolating and purifying an enzyme.

For example, when the protein of the present invention is expressed as a soluble product in the host cells, the cells are collected by centrifugation after culturing, suspended in an aqueous buffer, and disrupted using an ultrasonicator, a French press, a Manton Gaulin homogenizer, a Dymomill, or the like to obtain a cell-free extract.

(0061)

From the supernatant obtained by centrifuging the cell-free extract, a purified product can be obtained by the general method used for isolating and purifying an enzyme, for example, solvent extraction, salting-out using ammonium sulfate or the like, desalting, precipitation

using an organic solvent, anion exchange chromatography using a resin, such as diethylaminoethyl (DEAE)-Sepharose, DIAION HPA-75 (manufactured by Mitsubishi Chemical) or the like, cation exchange chromatography using a resin, such as S-Sepharose FF (manufactured by Pharmacia) or the like, hydrophobic chromatography using a resin, such as butyl sepharose, phenyl sepharose or the like, gel filtration using a molecular sieve, affinity chromatography, chromatofocusing, or electrophoresis, such as isoelectronic focusing or the like, alone or in combination thereof.

(0062)

When the protein is expressed as an inclusion body in the host cells, the cells are collected in the same manner, disrupted and centrifuged to recover the protein as the precipitate fraction. Next, the inclusion body of the protein is solubilized with a protein-denaturing agent.

The solubilized protein solution is diluted or dialyzed to lower the concentration of the protein denaturing agent in the solution. Thus, the normal tertiary structure of the protein is reconstituted. After the procedure, a purified product of the protein can be obtained by a purification/isolation method similar to the above.

(0063)

When the protein of the present invention or its glycosylated-derivative is secreted out of cells, the

protein or its derivative can be collected in the culture supernatant.

Namely, the culture supernatant is obtained by treating the culture medium in a treatment similar to the above, such as centrifugation or the like. Then a purified product can be obtained from the supernatant using a purification/isolation method similar to the above.

(0064)

Examples of the protein obtained by the above method include a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1.

Furthermore, a fusion protein of the protein of the present invention and other protein is produced, and can be purified using affinity chromatography using a substance having affinity to the fusion protein. For example, the protein of the present invention is produced as a fusion protein with protein A according to the method of Lowe et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8227 (1989); *Genes Develop.*, 4: 1288 (1990)), or the method described in Japanese Published Unexamined Patent Application No. 336963/93 or 823021/94, and it can be purified by affinity chromatography using immunoglobulin G.

(0065)

Moreover, the protein of the present invention is produced as a fusion protein with Flag peptide, and the fusion protein can be purified by affinity chromatography

using an anti-Flag antibody (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **86**: 8227 (1989)). Further purification can be carried out by affinity chromatography using the antibody against the protein *per se*.

(0066)

Also, based on the information of the thus obtained protein, the protein of the present invention can be produced by a chemical synthesis method, such as Fmoc (fluorenylmethyloxycarbonyl) method, tBoc (t-butyloxycarbonyl) method, or the like. It can also be chemically synthesized using a peptide synthesizer manufactured by Advanced ChemTech, Perkin-Elmer, Pharmacia, Protein Technology Instrument, Synthecell-Vega, PerSeptive, Shimadzu Corporation, or the like.

(3) Preparation of galactose-containing carbohydrate

A galactose-containing carbohydrate can be produced in an aqueous medium using a culture of the transformant obtained by culturing described in (2) or a treated product of the culture as the enzyme source.

(0067)

Examples of the treated product of culture include a concentrated product of the culture, a dried product of the culture, cells obtained by centrifuging the culture, a dried product of the cells, a freeze-dried product of the cells, a surfactant-treated product of the cells, an ultrasonic-treated product of the cells, a mechanically

disrupted product of the cells, a solvent-treated product of the cells, an enzyme-treated product of the cells, a protein fraction of the cells, an immobilized product of the cells, an enzyme preparation obtained by extracting from the cell, and the like.

(0068)

The enzyme source for use in the production of a galactose-containing carbohydrate is used in a concentration of 1 mU/l to 1,000 U/l, preferably 10 mU/l to 100 U/l, when the activity capable of forming 1 μ mol of galactose-containing carbohydrate at 37°C in 1 minute is defined as 1 unit (U).

Examples of the aqueous medium for use in the production of a galactose-containing carbohydrate include water, buffer solutions (for example, phosphate buffer, carbonate buffer, acetate buffer, borate buffer, citrate buffer, tris bufrer, etc.), alcohols (for example, methanol, ethanol, etc.), esters (for example, ethyl acetate, etc.), ketones (for example, acetone, etc.), amides (for example, acetamide, etc.), and the like. Also, the culture of the microorganisms used as the enzyme source can be used as an aqueous medium.

(0069)

In producing a galactose-containing carbohydrate, a surfactant or an organic solvent may be added, if necessary. Any surfactant capable of accelerating the formation of a

galactose-containing carbohydrate may be used as the surfactant. Examples include nonionic surfactants (for example, polyoxyethylene octadecylamine (e.g., Nymeen S-215, manufactured by Nippon Oil & Fats), etc.), cationic surfactants (for example, cetyltrimethylammonium bromide, alkyldimethyl benzylammoniumchloride (e.g., Cation F2-40E, manufactured by Nippon Oil & Fats), etc.), anionic surfactants (for example, lauroyl sarcosinate, etc.), tertiary amines (for example, alkyldimethylamine (e.g., Tertiary Amine FB, manufactured by Nippon Oil & Fats), etc.), and the like, which are used alone or as a mixture of two or more. The surfactant is used generally in a concentration of 0.1 to 50 g/l. Examples of the organic solvent include xylene, toluene, fatty acid alcohol, acetone, ethyl acetate, and the like, which are used in a concentration of generally 0.1 to 50 ml/l.

(0070)

The galactose-containing carbohydrate formation reaction is carried out in an aqueous medium having a pH 5 to 10, preferably 6 to 8, at 20 to 50°C for 1 to 96 hours. In this formation reaction, inorganic salts, such as $MnCl_2$, $MgCl_2$, and the like, can be added, if necessary.

The amount of the galactose-containing carbohydrate produced in the aqueous medium can be determined, for example, using a glycosyl analyzer manufactured by Dionex (Anal. Biochem., 189: 151 (1990)).

(0071)

The galactose-containing carbohydrate produced in the aqueous medium can be collected by the ordinary methods using activated carbon, ion exchange resins, and the like.

The present invention is explained based on the examples, but the scope of the present invention is not limited thereto.

(0072)

(Examples)

Example 1 Isolation of DNA containing β 1,3-galactosyltransferase gene:

(1) Cloning of capsular polysaccharide biosynthesis genes from *Streptococcus agalactiae* Type Ia (1)

Streptococcus agalactiae Type Ia was cultured by the method described in *J. Bacteriol.*, 181: 5176 (1999). After collecting the cells by centrifugation, chromosomal DNA of the microorganism was isolated and purified in accordance with the method described in *Current Protocols in Molecular Biology*.

(0073)

DNAs having the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOS:4 and 5 which had been designed based on the nucleotide sequence around the *cpsD* gene which is one of the capsular polysaccharide biosynthesis genes of *Streptococcus agalactiae* Type III (*Mol. Microbiol.*, 8: 843 (1993)) were synthesized using a DNA synthesizer Model 8905

manufactured by Perceptive Biosystems. Using these synthetic DNAs as a primer set, PCR was carried out using the chromosomal DNA of *Streptococcus agalactiae* Type Ia as the template. The PCR was carried out using 40 μ l of a reaction solution containing 0.1 μ g of the chromosomal DNA, 0.5 μ mol/l each primer, 2.5 units of TaKaRa LA Taq polymerase (manufactured by Takara Shuzo), 4 μ l of a buffer solution for TaKaRa LA Taq polymerase and 200 μ mol/l each deoxyNTP and repeating a reaction step consisting of 1 minute at 94°C, 2 minutes at 42°C and 3 minutes at 72°C 30 times. A probe was prepared by labeling the thus amplified fragment using Random Primer DNA Labeling Kit (manufactured by Takara Shuzo).

(0074)

Fragments obtained by digesting the chromosomal DNA of *Streptococcus agalactiae* Type Ia with a restriction enzyme EcoRI were ligated to pBluescript II SK(+) to prepare recombinant DNAs, and a library was prepared by transforming *E. coli* JM109 with these recombinant DNAs.

Using the above probe and library, colony hybridization was carried out according to the method known by persons having ordinary skill in the art to obtain a strain of clone showing a strong signal. A plasmid contained in this strain was named pBA101 and its structure was analyzed to find that it was a structure in which a 3.5 kb fragment derived from the chromosomal DNA of

Streptococcus agalactiae Type Ia was inserted into pBluescript II SK(+). The nucleotide sequence of the DNA was determined according to the method known by persons having ordinary skill in the art, and as a result, the three genes named *cpsIaF*, *cpsIaG* and *cpsIaH*, and a part of a gene named *cpsIaE* described in *J. Bacteriol.*, 181: 5176 (1999) were found in the DNA, so that it was confirmed that the DNA contains a part of the capsular polysaccharide biosynthesis genes. Also, as a result of homology search, it was confirmed that the *cpsIaE* gene and the *cpsIaG* gene had high homology with the glucosyltransferase gene and with the β 1,4-galactosyltransferase gene, respectively (Fig. 1).

(2) Cloning of capsular polysaccharide biosynthesis gene from *Streptococcus agalactiae* Type Ia (2)

The 3.5 kb fragment of *Streptococcus agalactiae* Type Ia, which had been inserted into the plasmid pBA101 obtained in (1) of Example 1, was labeled using Random Primer DNA Labeling Kit (manufactured by Takara Shuzo) to prepare a probe.

(0075)

Fragments obtained by digesting the chromosomal DNA of *Streptococcus agalactiae* Type Ia with a restriction enzyme *Bgl*II were ligated to pBluescript II SK(+) to prepare recombinant DNAs, and a library was prepared by transforming *E. coli* JM109 with these recombinant DNAs.

Using the above probe and library, colony hybridization was carried out so as to obtain a strain of clone showing a strong signal. A plasmid contained in this strain was named pBA103 and its structure was analyzed to find that it was a structure in which a 3.1 kb DNA derived from the chromosomal DNA of *Streptococcus agalactiae* Type Ia was inserted into pBluescript II SK(+). When the nucleotide sequence of the 3.1 kb DNA was determined according to the method known by persons having ordinary skill in the art, genes named *cpsIaI* and *cpsIaJ* and a part of the *cpsIaH* gene were found in the DNA, and it was confirmed that the DNA contained in pBA103 was a DNA adjacent to the DNA contained in pBA101 on the chromosomal DNA and that pBA103 is also a plasmid which contains a part of the DNA of the capsular polysaccharide biosynthesis genes. As a result of homology search, it was confirmed that the *cpsIaI* gene and the *cpsIaJ* gene have high homology with the β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase gene and the β 1,4-galactosyltransferase gene, respectively (Fig. 1, *J. Bacteriol.*, 181: 5176 (1999)).

(3) Isolation of DNA containing β 1,3-galactosyltransferase gene from *Streptococcus agalactiae* Type Ib

The 3.1 kb fragment of *Streptococcus agalactiae* Type Ia, which had been inserted into the plasmid pBA103 obtained in (2) of Example 1, was labeled using Random

Primer DNA Labeling Kit (manufactured by Takara Shuzo) to prepare a probe.

(0076)

Streptococcus agalactiae Type Ib was cultured by the method described in *J. Bacteriol.*, 181: 5176 (1999). After collecting the cells by centrifugation, chromosomal DNA of the microorganism was isolated and purified in accordance with the method described in *Current Protocols in Molecular Biology*.

Fragments obtained by digesting the chromosomal DNA of *Streptococcus agalactiae* Type Ib with a restriction enzyme *Bgl*II were introduced into pBluescript II SK(+) and transformed into *E. coli* JM109 to prepare a library.

(0077)

Using the above probe and library, colony hybridization was carried out to obtain two cloned strains showing a strong signal. Plasmids contained in these strains were named pBB102 and pBB103, respectively, and their structures were analyzed to find that they were structures in which 5.5 and 1.4 kb fragments derived from the chromosomal DNA of *Streptococcus agalactiae* Type Ib were inserted into pBluescript II SK(+), respectively (Fig. 1).

(0078)

When the nucleotide sequences of these two DNAs were determined according to the method known by persons

having ordinary skill in the art, it was determined that these two DNAs were present by adjacent to each other on the chromosomal DNA and having the continued nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:3. It was revealed that genes named *cpsIbE*, *cpsIbF*, *cpsIbG*, *cpsIbH*, *cpsIbI* and *cpsIbJ* are present in the DNA having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:3. As a result of homology search, the *cpsIbE* gene showed high homology with the *cpsIaE* gene and the glucosyltransferase gene, the *cpsIbG* gene with the *cpsIaG* gene and the β 1,4-galactosyltransferase gene, and the *cpsIbI* gene with the *cpsIaI* gene and the β 1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase gene. Accordingly, it was confirmed that the DNA having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:3 contains a part of the capsular polysaccharide biosynthesis genes in *Streptococcus agalactiae* Type Ib.

(0079)

Also, it was considered that the *cpsIbJ* gene is a gene comprising a DNA encoding a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity because the protein encoded by the *cpsIbJ* gene having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 has a preserved sequence of a glycosyltransferase but its homology with the *cpsIaJ* gene is low, a *cpsIaJ* gene product takes a role in transferring galactose in the capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* Type Ia (*J. Bacteriol.*, 181: 5176

(1999)), and the linkages of galactose of capsular polysaccharide in *Streptococcus agalactiae* Type Ia and *Streptococcus agalactiae* Type Ib are different, which are β 1,4 and β 1,3, respectively (J. Bacteriol., 181: 5176 (1999)). The amino acid sequence of the protein encoded by this DNA is shown in SEQ ID NO:1.

Example 2 Construction of a strain expressing β 1,3-galactosyltransferase gene:

A DNA containing the galactosyltransferase gene obtained in (3) of Example 1 was amplified by the following method using DNAs having the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOS:6 and 7 synthesized using DNA Synthesizer Model 8905 manufactured by Perceptive Biosystems.

(0080)

PCR was carried out using these synthesized DNAs as a primer set and the *Streptococcus agalactiae* Type Ib chromosomal DNA as the template. Using 40 μ l of a reaction solution containing 0.1 μ g of the chromosomal DNA, 0.5 μ mol/l each primer, 2.5 units of TaKaRa LA Taq polymerase (manufactured by Takara Shuzo), 4 μ l of a buffer solution for TaKaRa LA Taq polymerase and 200 μ mol/l each deoxyNTP, PCR was carried out by repeating a step of 94°C for 1 minute, 42°C for 2 minutes and 72°C for 3 minutes 30 times.

(0081)

After confirming amplification of the fragment of interest by subjecting 1/10 volume of the reaction solution to agarose gel electrophoresis, the amplified fragment was recovered from the remaining reaction solution using GeneClean II Kit (manufactured by Bio 101) and then dissolved in TE buffer (10 mmol/l Tris-HCl and 1 mmol/l EDTA (pH 8.0)) to obtain 20 μ l of the DNA solution.

Using 5 μ l of the dissolved solution, the DNA was digested with restriction enzymes *NotI* and *XhoI*, the resulting DNAs were separated using agarose gel electrophoresis and then a DNA of 2.0 kb was recovered using GeneClean II Kit.

(0082)

After 0.2 μ g of pBluescript II SK(+) DNA was digested with restriction enzymes *NotI* and *XhoI*, the resulting DNAs were separated by agarose gel electrophoresis and then a DNA of 3.0 kb was recovered using GeneClean II Kit.

Using a ligation kit, the 2.0 kb and 3.0 kb fragments were ligated at 16°C for 16 hours.

(0083)

Using the ligation reaction solution, *E. coli* JM109 was transformed in accordance with the method known by persons having ordinary skill in the art, and the transformants were spread on LB agar medium (10 g/l Bacto Tryptone (manufactured by Difco), 10 g/l Yeast Extract

(manufactured by Difco), 5 g/l sodium chloride, 15 g/l agar) containing 50 µg/ml ampicillin, followed by culturing overnight at 37°C.

By extracting plasmid from the thus grown transformant colonies in accordance with the method known by persons having ordinary skill in the art, an expression plasmid pBBPIJ was obtained. The structure of this plasmid was confirmed by restriction enzyme digestion (Fig. 2).

(0084)

In the same manner, PCR was carried out using DNAs having the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOs:7 and 8 synthesized using DNA Synthesizer Model 8905 manufactured by Perceptive Biosystems as a primer set and the *Streptococcus agalactiae* type Ib chromosomal DNA as the template.

After confirming amplification of the fragment of interest by subjecting 1/10 volume of the reaction solution to agarose gel electrophoresis, the amplified fragment was recovered from the remaining reaction solution using GeneClean II Kit (manufactured by Bio 101) to obtain 20 µl TE solution of the DNA.

(0085)

Using 5 µl of the solution, the DNA was digested with restriction enzymes *Eco*RI and *Xho*I, the resulting DNAs were separated by agarose gel electrophoresis and then a DNA of 1.0 kb was recovered using GeneClean II Kit.

After 0.2 μ g of pBluescript II SK(+) DNA was digested with restriction enzymes EcoRI and XhoI, the resulting DNAs were separated by agarose gel electrophoresis and then a DNA of 3.0 kb was recovered using GeneClean II Kit.

(0086)

Using a ligation kit, the 1.0 kb and 3.0 kb fragments were ligated at 16°C for 16 hours.

Using the ligation reaction solution, *E. coli* JM109 was transformed in accordance with the method known by persons having ordinary skill in the art, and the transformants were spread on LB agar medium containing 50 μ g/ml ampicillin, followed by culturing overnight at 37°C.

(0087)

By extracting plasmid from the thus grown transformant colonies in accordance with the method known by persons having ordinary skill in the art, an expression plasmid pBBPJ was obtained. The structure of this plasmid was confirmed by restriction enzyme digestion (Fig. 2).

Escherichia coli JM109/pBBPJ having the plasmid pBBPJ containing a DNA encoding a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from *Streptococcus agalactiae* Type Ib has been deposited as FERM BP-7400 on December 21, 2000 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi,

Ibaraki-ken, 305-8566 Japan) (present name and address: International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japan)).

Example 3 Production of lacto-*N*-tetraose:

Each of the *Escherichia coli* JM109/pBBPIJ and JM109/pBBPJ obtained in Example 2 was inoculated into a test tube charged with 8 ml of LB medium containing 50 μ g/ml ampicillin respectively, followed by culturing at 37°C for 17 hours. The culture was inoculated at 1% into a test tube charged with 8 ml of LB medium containing 50 μ g/ml ampicillin respectively, followed by culturing at 37°C for 5 hours, and then IPTG was added thereto to give a concentration of 1 mmol/l. Two hours after additional culturing, wet cells were obtained by centrifugation. A membrane fraction was prepared from the wet cells in accordance with the method known by persons having ordinary skill in the art (*J. Biol. Chem.*, 272: 19502 (1997), *Mol. Microbiol.*, 26: 197 (1997)). Since this membrane fraction can be stored at -80°C, if necessary, it was able to use it by thawing prior to use.

(0088)

Lacto-*N*-triose II to be used as the acceptor carbohydrate was prepared by allowing lacto-*N*-neotetraose (manufactured by Sigma) to react with β -galactosidase

(manufactured by Seikagaku Corporation), completely removing the non-reducing terminal galactose and then inactivating the β -galactosidase activity by heat treatment at 100°C for 5 minutes.

The reaction was carried out at 37°C for 72 hours in 0.1 ml of a reaction solution containing the JM109/pBBPIJ membrane fraction (200 μ g/ml), 50 mmol/l citrate buffer (pH 7.0), 5 mmol/l $MgCl_2$, 10 mmol/l lacto-N-triose II and 5 mmol/l UDP-galactose.

(0089)

After completion of the reaction, the reaction product was analyzed using a High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection system manufactured by Dionex (DX-500) under the following analyzing conditions to confirm that 0.2 mmol/l lacto-N-tetraose was produced and accumulated in the reaction solution.

In the same manner, it was confirmed that 0.05 mmol/l lacto-N-tetraose was produced and accumulated when a JM109/pBBPJ membrane fraction was used.

Analyzing conditions:

Column: CarboPAC PA10

Eluent: A; H_2O , B; 500 mmol/l NaOH

Gradient: 10 to 70% B in 20 min

Detector: Pulsed amperometric detector

(0090)

(Effect of the invention)

The present invention provides a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from a microorganism having an activity of transferring galactose to N-acetylglucosamine with β 1,3-linkage. A galactose-containing carbohydrate can be efficiently produced by using the enzyme.

(0091)

(Free text of sequence listing)

SEQ ID NO:4: Synthetic DNA

SEQ ID NO:5: Synthetic DNA

SEQ ID NO:6: Synthetic DNA

SEQ ID NO:7: Synthetic DNA

SEQ ID NO:8: Synthetic DNA

(0092)

(Sequence listing)

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Beta 1,3-galactosyltransferase and a DNA coding for said enzyme

<130> 11328

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211>

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae Type Ib

<400> 1

Met Asn Tyr Ser Ile Ile Met Ser Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asn Tyr

1 5 10 15

Val Arg Asp Ser Val Glu Ser Ile Leu Asn Gln Thr Leu Thr Asp Phe
20 25 30

Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Asn Pro Ser Arg Gly Asp Leu Lys Gln
35 40 45

Phe Leu Thr Glu Tyr Ser Val Val Asp Asn Arg Ile Lys Ile Leu Leu
50 55 60

Asn Glu Glu Asn Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Asn Lys Ala Val Lys
65 70 75 80

Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Ile Phe Arg Met Asp Ala Asp Asp Ile Ser
85 90 95

Tyr Pro Ser Arg Phe Asp Lys Gln Ile Arg Phe Met Glu Glu Asn Ser
100 105 110

Leu Asp Phe Ser Ala Thr Leu Ile Glu Leu Ile Asp Gln Lys Gly Asn
115 120 125

Leu Val Tyr Lys Gln Arg Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asn Asp
130 135 140

Ile Arg Lys Met Leu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Ala His Pro Thr Trp
145 150 155 160

Cys Val Lys Lys Val Phe Asp Lys Leu Met Gly Tyr Arg Asp Leu
165 170 175

Val Pro Val Glu Asp Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Gly Ala Leu Ala Asp
180 185 190

Phe Lys Ile Gly Leu Leu Asn Lys Val Leu Leu Gln Tyr Arg Leu Asn
195 200 205

Glu Asn Gly Ile Ser Gln Thr Asn Lys Phe Lys Gln Tyr Ile Tyr Ser
210 215 220

Ala Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Lys Glu Lys Ser Tyr Ile Asp Ile Thr

225	230	235	240
Lys Ile Thr Asn Tyr Phe Gln Glu Tyr Val Ile Lys Lys Arg Tyr Thr			
245	250	255	
Gln Gln Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Ser Thr Pro Ser Ile			
260	265	270	
Thr Ile Arg Lys Leu Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Tyr Phe Lys Ser Pro			
275	280	285	
Leu Val Arg Arg Leu Leu Ile Asn Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu Lys			
290	295	300	
Leu Phe Gly Gly Glu Lys Gln Ser Asp			
305	310	313	
<210> 2			
<211>			
<212> DNA			
<213> Streptococcus agalactiae Type Ib			
<400> 2			
atg aat tat agt atc att atg tcg gta tat aat gag cct tta aat tat			48
Met Asn Tyr Ser Ile Ile Met Ser Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asn Tyr			
1	5	10	15
gtg aga gat tca gta gaa tct ata tta aat caa acg ctt act gat ttt			
Val Arg Asp Ser Val Glu Ser Ile Leu Asn Gln Thr Leu Thr Asp Phe			96
20	25	30	
gag ttc ata att gtc att gat aat cca agt aga ggt gat tta aag caa			
Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Asn Pro Ser Arg Gly Asp Leu Lys Gln			144
35	40	45	
ttc tta aca gaa tat tca gtt gta gat aat aga ata aaa atc ttg ctt			
Phe Leu Thr Glu Tyr Ser Val Val Asp Asn Arg Ile Lys Ile Leu Leu			192
50	55	60	
aat gaa gaa aat att ggt tta gca tca agt ttg aac aaa gcg gtg aaa			
Asn Glu Glu Asn Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Asn Lys Ala Val Lys			240
65	70	75	80
att tct aag gga gaa tat att ttt aga atg gat gct gat gat att tca			
Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Ile Phe Arg Met Asp Ala Asp Asp Ile Ser			288
85	90	95	

tat cca agt aga ttt gat aag caa att cgt ttt atg gag gaa aat tca Tyr Pro Ser Arg Phe Asp Lys Gln Ile Arg Phe Met Glu Glu Asn Ser	100	105	110	336	
ttg gat ttc tca gca act cta ata gaa ttg ata gac caa aaa gga aat Leu Asp Phe Ser Ala Thr Leu Ile Glu Leu Ile Asp Gln Lys Gly Asn	115	120	125	384	
tta gta tat aaa caa cga gaa agt aat aaa ata tac tta act aat gat Leu Val Tyr Lys Gln Arg Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asn Asp	130	135	140	432	
ata cgg aag atg tta ttg aat aga tct ata ctt gcc cac cca acg tgg Ile Arg Lys Met Leu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Ala His Pro Thr Trp	145	150	155	160	480
tgc gta aaa aag aaa gtt ttc gat aag tta atg gga tat aga gat tta Cys Val Lys Lys Val Phe Asp Lys Leu Met Gly Tyr Arg Asp Leu	165	170	175	528	
gta cct gtt gaa gat tat gat ttt gca ata aga gga gct ctg gct gat Val Pro Val Glu Asp Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Gly Ala Leu Ala Asp	180	185	190	576	
ttc aaa atc ggc tta ctc aat aaa gta ctt tta cag tat aga tta aac Phe Lys Ile Gly Leu Leu Asn Lys Val Leu Leu Gln Tyr Arg Leu Asn	195	200	205	624	
gag aat gga ata tca caa acc aat aag ttt aag caa tat att tac tca Glu Asn Gly Ile Ser Gln Thr Asn Lys Phe Lys Gln Tyr Ile Tyr Ser	210	215	220	672	
gct att tta caa gat ttt tat aaa gaa aaa tct tat att gat atc aca Ala Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Lys Glu Lys Ser Tyr Ile Asp Ile Thr	225	230	235	240	720
aaa att act aat tac ttt caa gag tat gtg ata aag aaa cgc tat act Lys Ile Thr Asn Tyr Phe Gln Glu Tyr Val Ile Lys Lys Arg Tyr Thr	245	250	255	768	
cag caa gag ctc tct aaa tat ttt gag cta aaa tct acc cct agt att Gln Gln Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Ser Thr Pro Ser Ile	260	265	270	816	
act att aga aaa cta tat att tgt tta tat tta tac ttt aag tct ccc Thr Ile Arg Lys Leu Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Tyr Phe Lys Ser Pro				864	

275

280

285

ttg gtt agg agg tta tta ata aat gat att aat att tta gta ctg aaa 912
Leu Val Arg Arg Leu Leu Ile Asn Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu Lys
290 295 300

ttg ttt gga gga gag aaa caa agt gac 939
Leu Phe Gly Gly Glu Lys Gln Ser Asp
305 310

<210> 3

<211> 6865

<212> DNA

<213> Streptococcus agalactiae type Ib

<220>

<221> CDS

<222> (617)..(1789)

<220>

<221> CDS

<222> (1816)..(2262)

<220>

<221> CDS

<222> (2265)..(2744)

<220>

<221> CDS

<222> (2843)..(3979)

<220>

<221> CDS

<222> (3982)..(4953)

<220>

<221> CDS

<222> (5009)..(5947)

<400> 3

agatcttgg a gatattatct gtgaaaccaa t gttcc taga ctgatgg tgc ttcc tt cagg 60

gaaagtacca ccaa atccaa c a g c a t t a c t t c a g a a c g c t t a t t a a t a a t a g a t g a t t g a 120

agctt a t t a a a a t a t a t t g a t t a t t a t t a t t a t c a t c g a t a c t c c a c t t a t t g g t t i t a g t t g t 180

tgatgccgca ataatcgcta atgcttgcga tggtttatt ttagtaaccc aaggcaggtag 240
 aataaaaacgt aattatgttg aaaaagcaaa agaacagatg gaacaaagtg gttcaaagtt 300
 cttaggtatt attcttaata aagttaatga atctgttgc acttacggcg attatggaaa 360
 ttacggaaaa agggatagaa aaaggaagta aggggctt gtattgaaag aaaaagaaaa 420
 tatacaaaag attattatag cgatgattca aaccgttgc gtttattttt ctgcaagttt 480
 gacattaaca ttaattactc ccaactttaa aagcaataaa gatttattgt ttgttctatt 540
 gatacattat attgtctttt atcttctga ttttacaga gactttgga gtcgtggcta 600
 tcttgaagag tttaaa atg gta ttg aaa tac agc ttt tac tat att ttc ata 652
 Met Val Leu Lys Tyr Ser Phe Tyr Tyr Ile Phe Ile
 1 5 10

tca agt tca tta ttt ttt att tct aaa aac tct ttt aca acg aca cga 700
 Ser Ser Ser Leu Phe Phe Ile Ser Lys Asn Ser Phe Thr Thr Thr Arg
 15 20 25

ctt tcc ttt ttt act ttt att gct atg aat tcg att tta tta tat cta 748
 Leu Ser Phe Phe Thr Phe Ile Ala Met Asn Ser Ile Leu Leu Tyr Leu
 30 35 40

ttg aat tca ttt tta aaa tat tat cga aaa tat tct tac get aag ttt 796
 Leu Asn Ser Phe Leu Lys Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ser Tyr Ala Lys Phe
 45 50 55 60

tca cga gat acc aaa gtt gtt ttg ata acg aat aag gat tct tta tca 844
 Ser Arg Asp Thr Lys Val Val Leu Ile Thr Asn Lys Asp Ser Leu Ser
 65 70 75

aaa atg acc ttt agg aat aaa tac gac cat aat tat atc get gtc tgt 892
 Lys Met Thr Phe Arg Asn Lys Tyr Asp His Asn Tyr Ile Ala Val Cys
 80 85 90

atc ttg gat tcc tct gaa aag gat tgt tat gat ttg aaa cat aac tcg 940
 Ile Leu Asp Ser Ser Glu Lys Asp Cys Tyr Asp Leu Lys His Asn Ser
 95 100 105

tta agg ata ata aac aaa gat gct ctt act tca gag tta acc tgc tta 988
 Leu Arg Ile Ile Asn Lys Asp Ala Leu Thr Ser Glu Leu Thr Cys Leu
 110 115 120

act gtt gat caa gct ttt att aac ata ccc att gaa tta ttt ggt aaa		1036
Thr Val Asp Gln Ala Phe Ile Asn Ile Pro Ile Glu Leu Phe Gly Lys		
125	130	135
		140
tac caa ata caa gat att att aat gac att gaa gca atg gga gtg att		1084
Tyr Gln Ile Gln Asp Ile Ile Asn Asp Ile Glu Ala Met Gly Val Ile		
145	150	155
gtc aat gtt aat gta gag gca ctt agc ttt gat aat ata gga gaa aag		1132
Val Asn Val Asn Val Glu Ala Leu Ser Phe Asp Asn Ile Gly Glu Lys		
160	165	170
cga atc caa act ttt gaa gga tat agt gtt att aca tat tct atg aaa		1180
Arg Ile Gln Thr Phe Glu Gly Tyr Ser Val Ile Thr Tyr Ser Met Lys		
175	180	185
ttc tat aaa tat agt cac ctt ata gca aaa cga ttt ttg gat atc atg		1228
Phe Tyr Lys Tyr Ser His Leu Ile Ala Lys Arg Phe Leu Asp Ile Met		
190	195	200
ggt gct att ata ggt ttg ctc ata tgt ggc att gtg gca att ttt cta		1276
Gly Ala Ile Ile Gly Leu Leu Ile Cys Gly Ile Val Ala Ile Phe Leu		
205	210	215
		220
gtt ccg caa atc aga aaa gat ggt gga ccg gct atc ttt tct caa aat		1324
Val Pro Gln Ile Arg Lys Asp Gly Gly Pro Ala Ile Phe Ser Gln Asn		
225	230	235
aga gta ggt cgt aat ggt agg att ttt aga ttc tat aaa ttc aga tca		1372
Arg Val Gly Arg Asn Gly Arg Ile Phe Arg Phe Tyr Lys Phe Arg Ser		
240	245	250
atg cga gta gat gca gaa caa att aag aaa gat tta tta gtt cac aat		1420
Met Arg Val Asp Ala Glu Gln Ile Lys Lys Asp Leu Leu Val His Asn		
255	260	265
caa atg acg ggg cta atg ttt aag tta gac gat gat cct aga att act		1468
Gln Met Thr Gly Leu Met Phe Lys Leu Asp Asp Asp Pro Arg Ile Thr		
270	275	280
aaa ata gga aaa ttt att cga aaa aca agc ata gat gag ttg cct caa		1516
Lys Ile Gly Lys Phe Ile Arg Lys Thr Ser Ile Asp Glu Leu Pro Gln		
285	290	295
		300
ttc tat aat gtt tta aaa ggt gat atg agt tta gta gga aca cgc cct		1564

Phe	Tyr	Asn	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Met	Ser	Leu	Val	Gly	Thr	Arg	Pro	
																305
																310
																315
ccc aca gtt gat gaa tat gaa aag tat aat tca acg cag aag cga cgc																1612
Pro	Thr	Val	Asp	Glu	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Asn	Ser	Thr	Gln	Lys	Arg	Arg	
																320
																325
																330
ctt agt ttt aag cca gga atc act ggt ttg tgg caa ata tct ggt aga																1660
Leu	Ser	Phe	Lys	Pro	Gly	Ile	Thr	Gly	Leu	Trp	Gln	Ile	Ser	Gly	Arg	
																335
																340
																345
aat aat att act gat ttt gat gaa atc gta aag tta gat gtt caa tat																1708
Asn	Asn	Ile	Thr	Asp	Phe	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Leu	Asp	Val	Gln	Tyr	
																350
																355
																360
atc aat gaa tgg tct att tgg tca gat att aag att att ctc cta acg																1756
Ile	Asn	Glu	Trp	Ser	Ile	Trp	Ser	Asp	Ile	Lys	Ile	Ile	Leu	Leu	Thr	
																365
																370
																375
																380
cta aag gta gtt tta ctc ggg aca gga gct aag taaaggtaag gtttgaagg																1809
Leu	Lys	Val	Val	Leu	Leu	Gly	Thr	Gly	Ala	Lys						
																385
																390
aatata atg aaa att tgt ctg gtt ggt tca agt ggt cac cta gca																1857
Met	Lys	Ile	Cys	Leu	Val	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	His	Leu	Ala			
																395
																400
																405
cac ttg aac ctt ttg aaa ccc att tgg gaa aaa gaa gat agg ttt tgg																1905
His	Leu	Asn	Leu	Leu	Lys	Pro	Ile	Trp	Glu	Lys	Glu	Asp	Arg	Phe	Trp	
																410
																415
																420
gta act ttt gat aaa gaa gat gct agg agt att cta aga gaa gag att																1953
Val	Thr	Phe	Asp	Lys	Glu	Asp	Ala	Arg	Ser	Ile	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	
																425
																430
																435
gta tat cat tgc ttc ttt cca aca aac cgt aat gtc aaa aac ttg gta																2001
Val	Tyr	His	Cys	Phe	Phe	Pro	Thr	Asn	Arg	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Val	
																440
																445
																450
aaa aat act att cta gct ttt aag gtc ctt aga aaa gaa aga cca gat																2049
Lys	Asn	Thr	Ile	Leu	Ala	Phe	Lys	Val	Leu	Arg	Lys	Glu	Arg	Pro	Asp	
																455
																460
																465
gtt atc ata tca tct ggt gcc gct gta gca gta cca ttc ttt tat att																2097
Val	Ile	Ile	Ser	Ser	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Val	Pro	Phe	Phe	Tyr	Ile	
																470
																475
																480
																485

ggt aag tta ttt ggc tgt aag acc gtt tat ata gag gtt ttc gac agg Gly Lys Leu Phe Gly Cys Lys Thr Val Tyr Ile Glu Val Phe Asp Arg 490 495 500	2145
ata gat aaa cca act ttg aca gga aaa tta gtg tat cct gta aca gat Ile Asp Lys Pro Thr Leu Thr Gly Lys Leu Val Tyr Pro Val Thr Asp 505 510 515	2193
aaa ttt att gtt cag tgg gaa gaa atg aaa aaa gtt tat cct aag gca Lys Phe Ile Val Gln Trp Glu Glu Met Lys Lys Val Tyr Pro Lys Ala 520 525 530	2241
att aat tta gga gga att ttt ta atg att ttt gtc aca gta ggg aca Ile Asn Leu Gly Gly Ile Phe Met Ile Phe Val Thr Val Gly Thr 535 540 545	2288
cat gaa cag cag ttc aac cgt ctt att aaa gaa gtt gat aga tta aaa His Glu Gln Gln Phe Asn Arg Leu Ile Lys Glu Val Asp Arg Leu Lys 550 555 560	2336
ggg aca ggt gct att gat caa gaa gtg ttc att caa acg ggt tac tca Gly Thr Gly Ala Ile Asp Gln Glu Val Phe Ile Gln Thr Gly Tyr Ser 565 570 575 580	2384
gac ttt gaa cct cag aat tgt cag tgg tca aaa ttt ctc tca tat gat Asp Phe Glu Pro Gln Asn Cys Gln Trp Ser Lys Phe Leu Ser Tyr Asp 585 590 595	2432
gat atg aac tct tac atg aaa gaa gct gag att gtt atc aca cac ggc Asp Met Asn Ser Tyr Met Lys Glu Ala Glu Ile Val Ile Thr His Gly 600 605 610	2480
ggt cca gca acg ttt atg aat gca gtt tct aaa ggg aaa aaa act att Gly Pro Ala Thr Phe Met Asn Ala Val Ser Lys Gly Lys Lys Thr Ile 615 620 625	2528
gtg gtt cct aga caa gaa cag ttt gga gag cat gtg aat aat cat cag Val Val Pro Arg Gln Glu Gln Phe Gly Glu His Val Asn Asn His Gln 630 635 640	2576
gtg gat ttt ttg aaa gag tta ttc ttg aaa tat gag tta gat tat att Val Asp Phe Leu Lys Glu Leu Phe Leu Lys Tyr Glu Leu Asp Tyr Ile 645 650 655 660	2624
ttg aat atc agt gaa tta gag aat att att aag gaa aaa aat ata tct	2672

Leu Asn Ile Ser Glu Leu Glu Asn Ile Ile Lys Glu Lys Asn Ile Ser				
665	670	675		
act agt aaa gta ata tca caa aac aat gat ttt tgt tcc tct ttc aaa	2720			
Thr Ser Lys Val Ile Ser Gln Asn Asn Asp Phe Cys Ser Ser Phe Lys				
680	685	690		
aat gaa ctt tct aaa cta ttt gaa taaatatatt ttgttgaga aaaaaattga	2774			
Asn Glu Leu Ser Lys Leu Phe Glu				
695	700			
aattaactat caatccaaag tatttgttaa taggaggaat tttcgctta accctat	2834			
caaagcca atg caa ctt ttg tta ctt tta gca tta ata gtt tta ctt att	2884			
Met Gln Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ile Val Leu Leu Ile				
705	710			
tgt agt agt tat aat gaa aaa atg aaa ttt tta aat atg gct gaa att	2932			
Cys Ser Ser Tyr Asn Glu Lys Met Lys Phe Leu Asn Met Ala Glu Ile				
715	720	725	730	
ttt ttc att gta ttt tat atg gtt tat tta gta tca ata gta tta aat	2980			
Phe Phe Ile Val Phe Tyr Met Val Tyr Leu Val Ser Ile Val Leu Asn				
735	740	745		
tcg tta ttt aga agt cca gaa ttt cat aga gtc att gct gca ttc aat	3028			
Ser Leu Phe Arg Ser Pro Glu Phe His Arg Val Ile Ala Ala Phe Asn				
750	755	760		
tca ctg gca gta ggg gtt gtg tcc tta tta ttt tac cat tac tat aag	3076			
Ser Leu Ala Val Gly Val Val Ser Leu Leu Phe Tyr His Tyr Tyr Lys				
765	770	775		
aat act aat att gaa tta aca aaa ttg cta aaa tca ttt ttg ttt aat	3124			
Asn Thr Asn Ile Glu Leu Thr Lys Leu Leu Lys Ser Phe Leu Phe Asn				
780	785	790		
gca att att ttg ttt tgt tta gga ttt cta tat tat tat gcc ata tat	3172			
Ala Ile Ile Leu Phe Cys Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Tyr Ala Ile Tyr				
795	800	805	810	
ttt gat gta gag aat gta agt ctt ttt gga aga aat tta att gga tca	3220			
Phe Asp Val Glu Asn Val Ser Leu Phe Gly Arg Asn Leu Ile Gly Ser				
815	820	825		
gat tgg ata aat ggg atg cat acg cag aga gca atg gct ttc ttt gaa	3268			

Asp Trp Ile Asn Gly Met His Thr Gln Arg Ala Met Ala Phe Phe Glu			
830	835	840	
tat tca aat ctt ata ata ccc tta act atc ata act aat ata tat ata			3316
Tyr Ser Asn Leu Ile Ile Pro Leu Thr Ile Ile Thr Asn Ile Tyr Ile			
845	850	855	
tat ata tat att aag caa aga tat agc tca ggg atg atg ata ctc ggt			3364
Tyr Ile Tyr Ile Lys Gln Arg Tyr Ser Ser Gly Met Met Ile Leu Gly			
860	865	870	
gct ctt ctc tcc act att ata cta ccc atc ggg tct gga tct aga gct			3412
Ala Leu Leu Ser Thr Ile Ile Leu Pro Ile Gly Ser Gly Ser Arg Ala			
875	880	885	890
ggt att ata gtt gtg cta cta cag gtt ata att tta ttg ttg aat aca			3460
Gly Ile Ile Val Val Leu Leu Gln Val Ile Ile Leu Leu Leu Asn Thr			
895	900	905	
att gta ata aaa aga caa acg ata aga ttt ttc ctg tat tta gtt ccg			3508
Ile Val Ile Lys Arg Gln Thr Ile Arg Phe Phe Leu Tyr Leu Val Pro			
910	915	920	
ata cta ata tta cta tta gtg ata tta cgt ttt gat aat ttg gtg agc			3556
Ile Leu Ile Leu Leu Val Ile Leu Arg Phe Asp Asn Leu Val Ser			
925	930	935	
ata tat aat aga ata atc aat ttg cgg tcg gga agt agt gaa tct aga			3604
Ile Tyr Asn Arg Ile Ile Asn Leu Arg Ser Gly Ser Ser Glu Ser Arg			
940	945	950	
ttt tct ttg tac aag gat acc gta cac tca gta att act gac tca cta			3652
Phe Ser Leu Tyr Lys Asp Thr Val His Ser Val Ile Thr Asp Ser Leu			
955	960	965	970
ttt ctg gga aaa ggt gta aaa gaa ttg tgg tta aat agt gat tta cca			3700
Phe Leu Gly Lys Gly Val Lys Glu Leu Trp Leu Asn Ser Asp Leu Pro			
975	980	985	
cta gga tcg cat tcg acc tac ata ggt tat ttc tat aaa act ggc cta			3748
Leu Gly Ser His Ser Thr Tyr Ile Gly Tyr Phe Tyr Lys Thr Gly Leu			
990	995	1000	
ttt gga cta ata aat gtg att tta ggt ttg ttt cta att ctt att agc			3796
Phe Gly Leu Ile Asn Val Ile Leu Gly Leu Phe Leu Ile Leu Ile Ser			
1005	1010	1015	

att atc aag gaa gct aaa aag tca gat ttc tat tat gag ata gta ggg Ile Ile Lys Glu Ala Lys Lys Ser Asp Phe Tyr Tyr Glu Ile Val Gly 1020 1025 1030	3844
tct gtc ata ctc cta ttt tca ttt ttt gca ctt gaa gat att gat ggc Ser Val Ile Leu Leu Phe Ser Phe Ala Leu Glu Asp Ile Asp Gly 1035 1040 1045 1050	3892
gcc aat tgg ctc att att ttt gtc ttt aca gtg ttg gga att tta gaa Ala Asn Trp Leu Ile Ile Phe Val Phe Thr Val Leu Gly Ile Leu Glu 1055 1060 1065	3940
aat aag gat ttc tat agt caa ctt aaa agg tgg gaa agt ta atg gaa Asn Lys Asp Phe Tyr Ser Gln Leu Lys Arg Trp Glu Ser Met Glu 1070 1075 1080	3987
aaa caa ata ctt gtt tct atc gtt ata cct ata tac aac tcg gaa gca Lys Gln Ile Leu Val Ser Ile Val Ile Pro Ile Tyr Asn Ser Glu Ala 1085 1090 1095	4035
tat ctt aaa gaa tgc gtg caa tcc gtc cta caa cag act cat tca ttg Tyr Leu Lys Glu Cys Val Gln Ser Val Leu Gln Gln Thr His Ser Leu 1100 1105 1110	4083
ata gaa gtt ata ctg att aat gat gga tcc act gat aat agt gga gaa Ile Glu Val Ile Leu Ile Asn Asp Gly Ser Thr Asp Asn Ser Gly Glu 1115 1120 1125	4131
att tgt gat aat tta tct caa aaa gac gat cgc ata ctt gta ttt cat Ile Cys Asp Asn Leu Ser Gln Lys Asp Asp Arg Ile Leu Val Phe His 1130 1135 1140 1145	4179
aaa aaa aat gga ggg gta tct tcg gca agg aac cta ggt ctt gat aaa Lys Lys Asn Gly Gly Val Ser Ser Ala Arg Asn Leu Gly Leu Asp Lys 1150 1155 1160	4227
tcc aca ggc gaa ttc ata acg ttt gta gat agt gat gat ttt gta gca Ser Thr Gly Glu Phe Ile Thr Phe Val Asp Ser Asp Asp Phe Val Ala 1165 1170 1175	4275
ccg aat ata att gaa ata atg tta aaa aat tta atc act gag gag gat gct Pro Asn Ile Ile Glu Ile Met Leu Lys Asn Leu Ile Thr Glu Asp Ala 1180 1185 1190	4323
gat ata gca gaa gta gat ttt gat att tcg aat gag aga gat tat aga	4371

Asp Ile Ala Glu Val Asp Phe Asp Ile Ser Asn Glu Arg Asp Tyr Arg				
1195	1200	1205		
aag aaa aaa aga cga aac ttt tat aag gtc ttt aaa aac aat aat tct				4419
Lys Lys Lys Arg Arg Asn Phe Tyr Lys Val Phe Lys Asn Asn Asn Ser				
1210	1215	1220	1225	
tta aaa gaa ttt tta tca ggt aat aga gtg gaa aat att gtt tgt aca				4467
Leu Lys Glu Phe Leu Ser Gly Asn Arg Val Glu Asn Ile Val Cys Thr				
1230	1235	1240		
aaa tta tat aaa aaa agt ata att ggt aac ttg agg ttt gat gag aat				4515
Lys Leu Tyr Lys Lys Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg Phe Asp Glu Asn				
1245	1250	1255		
tta aaa att ggt gag gat tta ctt ttt aat tgt aaa att tta tgt caa				4563
Leu Lys Ile Gly Glu Asp Leu Leu Phe Asn Cys Lys Ile Leu Cys Gln				
1260	1265	1270		
gag cac tgc ata gtc gta gat acg act tct tcc ttg tac acc tat cgc				4611
Glu His Cys Ile Val Val Asp Thr Thr Ser Ser Leu Tyr Thr Tyr Arg				
1275	1280	1285		
atc gta aag act tct gca atg aat cag gag ttc aac gaa aat tca tta				4659
Ile Val Lys Thr Ser Ala Met Asn Gln Glu Phe Asn Glu Asn Ser Leu				
1290	1295	1300	1305	
gat ttt ata aca att ttt aat gaa ata agc agt att gtt cct gca aaa				4707
Asp Phe Ile Thr Ile Phe Asn Glu Ile Ser Ser Ile Val Pro Ala Lys				
1310	1315	1320		
tta gct aat tat gtt gaa gcg aaa ttt tta aga gaa aag gta aag tgt				4755
Leu Ala Asn Tyr Val Glu Ala Lys Phe Leu Arg Glu Lys Val Lys Cys				
1325	1330	1335		
ctc cga aaa atg ttt gaa tta ggt agt aat att gac agt aaa atc aaa				4803
Leu Arg Lys Met Phe Glu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Ser Lys Ile Lys				
1340	1345	1350		
tta caa cga gag att ttt ttc aaa gat gtt aaa tta tac cct ttc tat				4851
Leu Gln Arg Glu Ile Phe Phe Lys Asp Val Lys Leu Tyr Pro Phe Tyr				
1355	1360	1365		
aaa gcg gtt aag tac tta tca tta aag gga tta ttg agt att tac tta				4899
Lys Ala Val Lys Tyr Leu Ser Leu Lys Gly Leu Leu Ser Ile Tyr Leu				
1370	1375	1380	1385	

atg aaa tgt tca ccc atc ttg tat ata aaa tta tat gac agg ttt caa Met Lys Cys Ser Pro Ile Leu Tyr Ile Lys Leu Tyr Asp Arg Phe Gln 1390 1395 1400	4947
aaa cag taagtaatca aaaattaaat taactcaatt acctttaaa ttataggagt Lys Gln	5003
tgaaa atg aat tat agt atc att atg tcg gta tat aat gag cct tta aat Met Asn Tyr Ser Ile Ile Met Ser Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asn 1405 1410 1415	5053
tat gtg aga gat tca gta gaa tct ata tta aat caa acg ctt act gat Tyr Val Arg Asp Ser Val Glu Ser Ile Leu Asn Gln Thr Leu Thr Asp 1420 1425 1430	5101
ttt gag ttc ata att gtc att gat aat cca agt aga ggt gat tta aag Phe Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Asn Pro Ser Arg Gly Asp Leu Lys 1435 1440 1445 1450	5149
caa ttc tta aca gaa tat tca gtt gta gat aat aga ata aaa atc ttg Gln Phe Leu Thr Glu Tyr Ser Val Val Asp Asn Arg Ile Lys Ile Leu 1455 1460 1465	5197
ctt aat gaa gaa aat att ggt tta gca tca agt ttg aac aaa gcg gtg Leu Asn Glu Glu Asn Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Asn Lys Ala Val 1470 1475 1480	5245
aaa att tct aag gga gaa tat att ttt aga atg gat gct gat gat att Lys Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Ile Phe Arg Met Asp Ala Asp Asp Ile 1485 1490 1495	5293
tca tat cca agt aga ttt gat aag caa att cgt ttt atg gag gaa aat Ser Tyr Pro Ser Arg Phe Asp Lys Gln Ile Arg Phe Met Glu Asn 1500 1505 1510	5341
tca ttg gat ttc tca gca act cta ata gaa ttg ata gac caa aaa gga Ser Leu Asp Phe Ser Ala Thr Leu Ile Glu Leu Ile Asp Gln Lys Gly 1515 1520 1525 1530	5389
aat tta gta tat aaa caa cga gaa agt aat aaa ata tac tta act aat Asn Leu Val Tyr Lys Gln Arg Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asn 1535 1540 1545	5437
gat ata cgg aag atg tta ttg aat aga tct ata ctt gcc cac cca acg Asp Ile Arg Lys Met Leu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Ala His Pro Thr	5485

1550	1555	1560	
tgg tgc gta aaa aag aaa gtt ttc gat aag tta atg gga tat aga gat Trp Cys Val Lys Lys Lys Val Phe Asp Lys Leu Met Gly Tyr Arg Asp 1565	1570	1575	5533
tta gta cct gtt gaa gat tat gat ttt gca ata aga gga gct ctg gct Leu Val Pro Val Glu Asp Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Gly Ala Leu Ala 1580	1585	1590	5581
gat ttc aaa atc ggc tta ctc aat aaa gta ctt tta cag tat aga tta Asp Phe Lys Ile Gly Leu Leu Asn Lys Val Leu Gln Tyr Arg Leu 1595	1600	1605	5629
aac gag aat gga ata tca caa acc aat aag ttt aag caa tat att tac Asn Glu Asn Gly Ile Ser Gln Thr Asn Lys Phe Lys Gln Tyr Ile Tyr 1615	1620	1625	5677
tca gct att tta caa gat ttt tat aaa gaa aaa tct tat att gat atc Ser Ala Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Lys Glu Lys Ser Tyr Ile Asp Ile 1630	1635	1640	5725
aca aaa att act aat tac ttt caa gag tat gtg ata aag aaa cgc tat Thr Lys Ile Thr Asn Tyr Phe Gln Glu Tyr Val Ile Lys Lys Arg Tyr 1645	1650	1655	5773
act cag caa gag ctc tct aaa tat ttt gag cta aaa tct acc cct agt Thr Gln Gln Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Ser Thr Pro Ser 1660	1665	1670	5821
att act att aga aaa cta tat att tgt tta tat tta tac ttt aag tct Ile Thr Ile Arg Lys Leu Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Tyr Phe Lys Ser 1675	1680	1685	5869
ccc ttg gtt agg agg tta tta ata aat gat att aat att tta gta ctg Pro Leu Val Arg Arg Leu Leu Ile Asn Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu 1695	1700	1705	5917
aaa ttg ttt gga gga gag aaa caa agt gac taatagaaaa atttatgtat Lys Leu Phe Gly Gly Glu Lys Gln Ser Asp 1710	1715		5967
gtcatactct ttatcattta ttgatttggtt tatataaaga agagatatat tcaaatttag 6027			
aaattattct ctcttcttct attcctgatg ttgataattt agagaaaaaa taaaatcaa 6087			

aaacaataaa tatacatatt ttagaagaat ctagtggta aagtgaagaa ttattatcag 6147
tacttaaaga tgctggtcta agttatagta agttttagat taattgttt attttaatg 6207
atgcaacgcc tattgggagg acactaataa agcatggat ttattataat ctaattgaag 6267
atggttaaa ttgtttact tactctatat ttagtcaaaa actttggaag tattatgtaa 6327
aaaaatataat tcttcacaaa attcagccac atggatttc acgatattgt ttagggattg 6387
aagtttaattc attagttat ttgccaaagg atccgcgtt taaaaaattt attgaagtcc 6447
ctaggaaga acttttgac aatgtacag aatatcaaaa agaaatggca ataaatctt 6507
ttggagcagt aagagttgt attaaatcac cttcagttact agtattaacg cagcctctat 6567
ctatagataa agagttatg agttataaca ataagataga aacgtccgaa gaacaattt 6627
attttataa atcaatagtc aatgaatata taaataaagg gtacaatgtt tatttaaaag 6687
ttcatcctag agatgttagta gattattcca aattgccgtt agagctatta ccatcaaattg 6747
ttcctatgga aattatagag ttgatgttaa caggtcggtt cgaatgtggg ataacacatt 6807
cgtccactgc gctggatttt ttaacttgc ttgataaaaaa aataacttta gtagatct 6865

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 4
gggggatcca atggatttga aatacag

27

<210> 5
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 5
aatctgcaga cttagctcct gtcccgagt

29

<210> 6	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic DNA	
<400> 6	
ccaagcgcc gctatagtca acttaaaagg tgg	33
<210> 7	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic DNA	
<400> 7	
cggctcgagt cccaataggc gttgcatt	28
<210> 8	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic DNA	
<400>	
ccggaattcg aaaaggtaaa gtgtctccga aa	32

(Brief explanation of the drawings)

(Fig. 1) shows the structure of capsular polysaccharide biosynthesis genes in *Streptococcus agalactiae* Type Ia and Type Ib.

(Fig. 2) shows the construction steps of β 1,3-galactosyltransferase plasmids pBBPIJ and pBBPJ.

(Explanation of symbols)

Plac: lac promoter

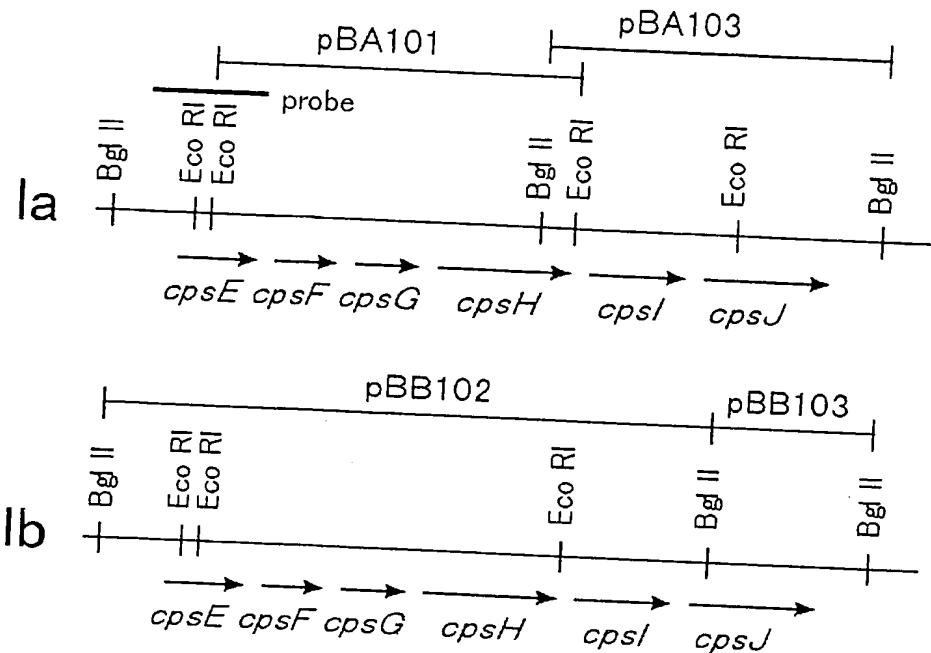
cpsI: β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase gene

cpsJ: β 1,4-galactosyltransferase gene

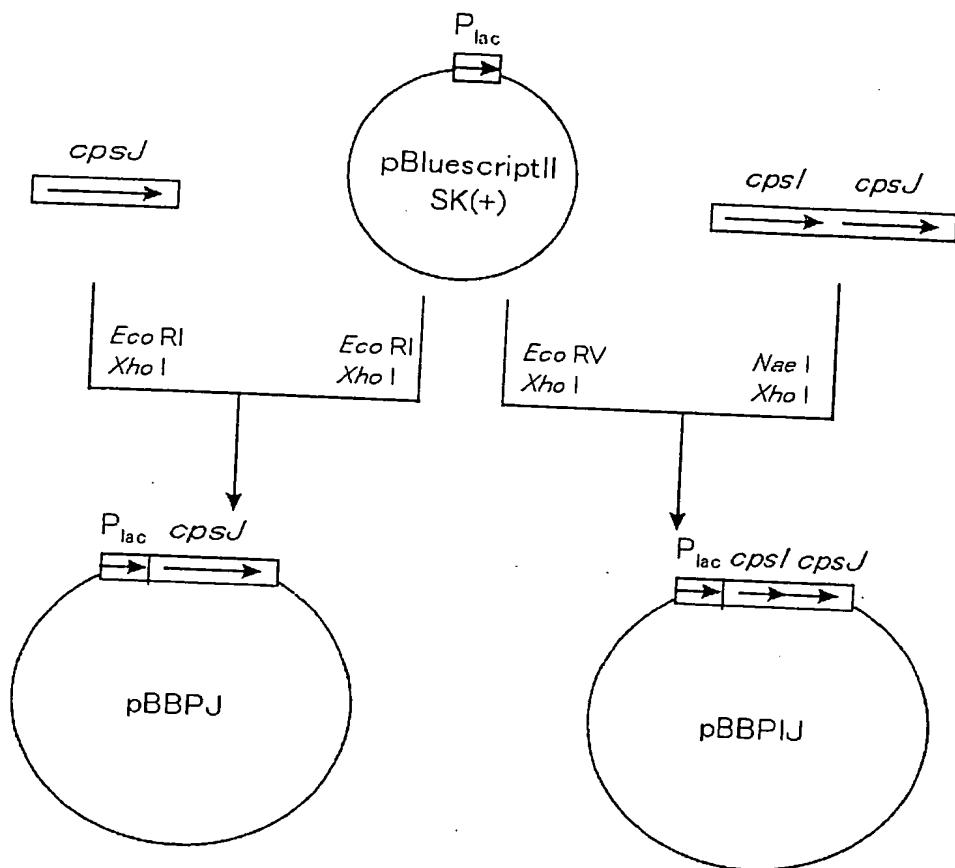
(Document name)

Drawings

(Fig. 1)



(Fig. 2)



(Document name)

Abstract

(Abstract)

(Problems)

It is to provide a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity, a DNA encoding the protein, a method for producing a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity using a transformant containing the DNA, and a method for producing a galactose-containing carbohydrate using the protein.

(Means for solution)

The present invention provides a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity, a DNA encoding the protein, a recombinant DNA containing the DNA, a transformant containing the recombinant DNA, a method for producing a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity using the transformant, and a method for producing a galactose-containing carbohydrate using the transformant.

(Selected drawing)

None

整理番号＝H 1 2 - 2 1 1 A 4

提出日 平成 13 年 1 月 5 日
頁： 1 / 1

A

【書類名】 特許願

【整理番号】 H 1 2 - 2 1 1 A 4

【特記事項】 特許法第 30 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特許出願

【提出日】 平成 13 年 1 月 5 日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C 12 P 19 / 00

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学内

【氏名】 三宅 克英

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学内

【氏名】 渡邊 正樹

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学内

【氏名】 飯島 信司

【特許出願人】

【識別番号】 0 0 0 0 0 1 0 2 9

【氏名又は名称】 協和醸酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 0 0 8 1 8 7

【納付金額】 2 1 0 0 0

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 β 1, 3-ガラクトース転移酵素および該酵素をコードするDNA

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 N-アセチルグルコサミンに β 1, 3 結合でガラクトースを転移する活性を有する微生物由来の β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質。

【請求項 2】 微生物が、ストレプトコッカス属に属する微生物である請求項 1 に記載の蛋白質。

【請求項 3】 ストレプトコッカス属に属する微生物が、ストレプトコッカス・アガラクチエである請求項 2 に記載の蛋白質。

【請求項 4】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。

【請求項 5】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質。

【請求項 6】 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードするDNA。

【請求項 7】 配列番号 2 で表される塩基配列からなるDNA。

【請求項 8】 配列番号 2 で表される塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項 9】 請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

【請求項 10】 請求項 9 に記載の組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 11】 宿主細胞が、微生物である請求項 10 に記載の形質転換体。

【請求項 12】 微生物が、エシェリヒア属に属する微生物である請求項 1 に記載の形質転換体。

【請求項13】 エシェリヒア属に属する微生物がエシェリヒア・コリである請求項12に記載の形質転換体。

【請求項14】 請求項10～13のいずれか1項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取する、 β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質の製造方法。

【請求項15】 請求項10～13のいずれか1項に記載の形質転換体の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ウリジン-5'-ニリン酸ガラクトースおよび受容体糖質を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でガラクトース含有糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中からガラクトース含有糖質を採取することを特徴とするガラクトース含有糖質の製造法。

【請求項16】 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩碎処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品である請求項15に記載の製造法。

【請求項17】 受容体糖質が、非還元末端にN-アセチルグルコサミンを有する糖質である請求項15に記載の製造法。

【請求項18】 受容体糖質が、N-アセチルグルコサミン、またはラクト-N-トリオースIIである請求項15に記載の製造法。

【請求項19】 ガラクトース含有糖質が、ラクト-N-ビオース、またはラクト-N-テトラオースである請求項15に記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを含有する組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、該形質転換体を用いた β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性

を有する蛋白質の製造法、および該形質転換体を用いたガラクトース含有糖質の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

β 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子に関しては、高等動物由来の遺伝子[J. Biol. Chem., 273, 58 (1998)、J. Biol. Chem., 273, 12770 (1998)、J. Biol. Chem., 274, 12499 (1999)]が取得されているが、一般に動物細胞由来の遺伝子を微生物を用いて活性のある蛋白質として発現させることは困難な場合が多く、動物由来の β 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子を大腸菌などの微生物を用いて活性のある蛋白質として発現させた例はない。

【0003】

一方、微生物においては、キャンピロバクター・ジェジュニから β 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子が取得されており、大腸菌を用いて該酵素遺伝子を発現させた報告があるが、該酵素は、N-アセチルガラクトサミンにガラクトースを転移する活性を有するが、N-アセチルグルコサミンにガラクトースを転移する活性については報告されていない[J. Biol. Chem., 274, 12499 (1999)]。

【0004】

人乳中にはガラクトース含有糖質（ラクト- N -テトラオースが主要成分のひとつ）が豊富に含まれている [Acta Paediatr., 82, 903 (1993)、J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 30, 181 (2000)]。ガラクトース含有オリゴ糖であるラクト- N -テトラオースやラクト- N -ネオテトラオースは、シードモナス・エアルギノーサにより認識されることが知られていることから [Infect. Immun., 59, 700 (1991)]、ガラクトース含有糖質はシードモナス・エアルギノーサの人体への感染を妨げる、安全な感染予防薬の有力な候補と考えられる。

【0005】

しかしながら、ラクト- N -テトラオースなどのガラクトース含有糖質の製造に関しては、人乳からの抽出法や化学合成法が知られているが、いずれもコスト面や生産性の面で問題があり、工業的な製造法は未だ確立されていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、 β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを用いた β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質の製造法、および該蛋白質を用いたガラクトース含有糖質の製造法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行い、ストレプトコッカス・アガラクチエの夾膜多糖生合成に関与する遺伝子群の中に、これまで見出されていなかった β 1, 3-ガラクトース転移酵素をコードするDNAを見出し、該DNAを取得することにより本発明を完成するに至った。

【0008】

即ち、本発明は以下の(1)～(19)に関する。

- (1) N-アセチルグルコサミンに β 1, 3結合でガラクトースを転移する活性を有する微生物由来の β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質。
- (2) 微生物が、ストレプトコッカス属に属する微生物である上記(1)の蛋白質。
- (3) ストレプトコッカス属に属する微生物が、ストレプトコッカス・アガラクチエである上記(2)の蛋白質。
- (4) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。
- (5) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が消失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質。
- (6) 上記(1)～(5)のいずれか1つの蛋白質をコードするDNA。
- (7) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA。
- (8) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA。
- (9) 上記(6)～(8)のいずれか1つのDNAをベクターに組み込んで得

られる組換え体DNA。

(10) 上記(9)の組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(11) 宿主細胞が、微生物である上記(10)の形質転換体。

(12) 微生物が、エシェリヒア属に属する微生物である上記(11)に記載の形質転換体。

(13) エシェリヒア属に属する微生物がエシェリヒア・コリである上記(12)の形質転換体。

(14) 上記(10)～(13)のいずれか1つの形質転換体を培地に培養し、培養物中に β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取する、 β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質の製造方法。

(15) (10)～(13)のいずれか1つの形質転換体の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ウリジン-5'-ニリン酸ガラクトースおよび受容体糖質を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でガラクトース含有糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中からガラクトース含有糖質を採取することを特徴とするガラクトース含有糖質の製造法。

(16) 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩碎処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品である上記(15)の製造法。

(17) 受容体糖質が、非還元末端にN-アセチルグルコサミンを有する糖質である上記(15)の製造法。

(18) 受容体糖質が、N-アセチルグルコサミン、またはラクト-N-トリオースIIである上記(15)の製造法。

(19) ガラクトース含有糖質が、ラクト-N-ビオース、またはラクト-N-テトラオースである上記(15)の製造法。

【発明の実施の形態】

本発明の β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質は、非還元末端にN-アセチルグルコサミン（以下、GlcNAcと略す）を有する受容体糖質を基質とする微生物由来の β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質であり、例えば、好ましくはストレプトコッカス属に属する微生物由来の β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質、より好ましくはストレプトコッカス・アガラクチエ由来の β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をあげることができる。

【0010】

本発明の蛋白質として、具体的には、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をあげることができ、また、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1つ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質もまた本発明の蛋白質としてあげることができる。

【0011】

上記の1つ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)（以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、Nucleic Acids Res., 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Res., 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAに変異を導入することにより取得することができる。

【0012】

欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数であり、1個

～数十個、好ましくは1個～20個、より好ましくは1個～10個、さらに好ましくは1個～5個である。

また、本発明の蛋白質が β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するために、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403(1990)] やFASTA [Methods. Enzymol., 183, 63(1990)] 等を用いて計算したときに、配列番号1で表されるアミノ酸配列と少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましく95%以上の相同性を有していることが好ましい。

【0013】

本発明のDNAとしては、上記本発明の蛋白質をコードするDNAをあげることができる。

具体的には、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、配列番号2で表される塩基配列からなるDNA、または配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなるDNAであり、かつ β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAをあげることができる。

【0014】

上記のストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、配列番号2で表される塩基配列からなるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0 mol/lの塩化ナトリウム存在下、65°Cでハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/l 塩化ナトリウム、15 mmol/l クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65°C条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

【0015】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)

等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLASTやFASTA等を用いて計算したときに、配列番号2で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0016】

本発明の β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質を生産する形質転換体は、例えば上記した本発明のDNAをモレキュラー・クローニング第2版に記載の方法に従ってベクターDNAと連結することで組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAを用いてモレキュラー・クローニング第2版に記載の方法に従い宿主細胞を形質転換することにより取得することができる。

【0017】

以下に本発明を詳細に説明する。

[1] 本発明のDNAの調製

本発明のDNAはストレプトコッカスに属する微生物より調製することができる。ストレプトコッカスに属する微生物としては、例えばストレプトコッカス・アガラクチエをあげることができ、具体的にはストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib等をあげることができる。

【0018】

ストレプトコッカスに属する微生物を公知の方法[例えば、J. Bactriol., 181, 5176 (1999)に記載の方法]により培養する。

培養後、公知の方法(例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法)により、該微生物の染色体DNAを単離精製する。

本発明のDNAを含む断片は、ストレプトコッカス・アガラクチエ Type III またはType Iaの夾膜多糖合成遺伝子群中の塩基配列に基づいて設計された合成DNAを用いて、ハイブリダイゼイション法、PCR法などにより取得することができる。

【0019】

該DNAを連結するベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製可能なベクターであればファージベクター、プラスミドベクター等いずれも使用可能であるが、具体的には、ZAP Express[ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+)[ストラタジーン社製、Nucleic Acids Res., 17, 94 94 (1989)]、λzap II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11[DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、λ TriplEx (クローンテック社製)、λ ExCell (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、pUC18[Gene, 33, 103 (1985)]等をあげることができる。

【0020】

該ベクターに上記で取得した本発明のDNAを連結して得られる組換え体DNAの宿主に用いるエシエリヒア・コリは、エシエリヒア・コリに属する微生物であればいずれでも用いることができるが、具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]等をあげることができる。

【0021】

組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法(特開昭63-2483942)、エレクトロポレーション法[Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]等をあげることができる。

【0022】

上記のようにして得られた形質転換体から組換え体DNAを抽出し、該組換えDNAに含まれる本発明のDNAの塩基配列を決定することができる。塩基配列の決定には、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジデオキシ法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]または373A-DNAシークエンサー(バー

キン・エルマー社製) 等の塩基配列分析装置を用いることができる。

【0023】

また、上記において決定されたDNAの塩基配列に基づいて、バーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置等を用いて化学合成することによっても目的とするDNAを調製することもできる。

上記のようにして取得した組換え体DNAを保有する形質転換体として、例えば配列番号2で表される塩基配列を有するプラスミドDNAを保有するEscherichia coli JM109/pBBPJをあげることができる。

〔2〕本発明の蛋白質の調製

本発明の蛋白質は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、上記〔1〕の方法により取得した本発明のDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

【0024】

本発明のDNAを用いる際には、必要に応じて、本発明の蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製することができる。また、該蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、該蛋白質の生産率を向上させることもできる。

本発明のDNAを発現する形質転換体は、上記DNA断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより取得することができる。

【0025】

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0026】

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のDNAを含有してなる組換え体DNAは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、より構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0027】

発現ベクターとしては、pHelix1(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)、pKK233-2(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、pSE280(インビトロジエン社製)、pGEMEX-1(プロメガ社製)、pQE-8(キアゲン社製)、pET-3(ノバジエン社製)、pKYP10(特開昭58-110600)、pKYP200[Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1[Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK(+)、pBluescript I KS(+) (ストラタジーン社製)、pTrS30 [大腸菌JM109/pTrS30(FERM BP-5407)より調製]、pTrS32 [大腸菌JM109/pTrS32(FERM BP-5408)より調製]、pPAC31 (WO 98/12343)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28(宝酒造社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pPA1(特開昭63-233798)等を例示することができる。

【0028】

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター (P1ac)、PLプロモーター、PRプロモーター、PSEプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター (Ptrp × 2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0029】

リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換え体DNAにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0030】

原核生物としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属、ストレプトコッカス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus megaterium、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium ammoniagene、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110、Streptococcus agalactiae Type Ia、Streptococcus agalactiae Type Ib、Streptococcus agalactiae Type III、Streptococcus pneumoniae Type 14等をあげることができる。

【0031】

組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法(特開昭63-2483942)、エレクトロポレーション法[Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]等をあげることができる。

【0032】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等

を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【0033】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベルミセス属、トリコスporon属、シワニオミセス属、ピチア属、キャンディダ属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris、Candida utilis等をあげることができる。

【0034】

組換え体DNAの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法[Methods Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法[J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]等をあげることができる。

【0035】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8(フナコシ社より市販)、pAGE107(特開平3-22979)、pAS3-3(特開平2-227075)、pCDM8[Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp(インビトロジエン社製)、pREP4(インビトロジエン社製)、pAGE103[J. Biochem, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pAMo、pAMoA等を用いることができる。

【0036】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロ

モーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0037】

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞またはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

【0038】

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)、293等、ヒト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

組換え体DNAの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

【0039】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Molecular Biology, A Laboratory Manual, Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

【0040】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにインビトロジェン社製）等をあげることができる。

【0041】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盜蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレア・ポリヘドロシス・ウイルス(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

【0042】

*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞としてはSf9、Sf21（バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル）等、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4（インビトロジェン社製）等、カイコ卵巣由来の培養細胞としては*Bombyx mori* N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

【0043】

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

【0044】

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であれ

ばいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等をあげることができる。

【0045】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

【0046】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明の蛋白質を製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0047】

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパンノール等のアルコール類等を用いることができる。

【0048】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチ

ーブリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

【0049】

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15~40°Cがよく、培養時間は、通常5時間~7日間である。培養中pHは3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0050】

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロビル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0051】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地[J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地[Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地[Virology, 8, 396 (1959)]、199培地[Proc. Soc. Biol. Med., 73, 1 (1950)]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0052】

培養は、通常pH6~8、25~40°C、5% CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(ファーミンジエン社製)、Sf-900 II SFM培地(ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell1400、ExCell1405[いずれもJRHバイオサイエンシーズ社製]、Grace's Insect Medium[Nature, 195, 788 (1962)]等を用いることができる。

【0053】

培養は、通常pH6~7、25~30°C等の条件下で1~5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

【0054】

培養は、通常pH5~9、20~40°Cの条件下で3~60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、本発明の蛋白質をコードするDNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

【0055】

本発明の蛋白質の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる蛋白質の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

本発明の蛋白質が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポルソンらの方法[J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法[Proc.

Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]
、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【0056】

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明の蛋白質の活性部位を含む蛋白質の手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明の蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0057】

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて本発明の蛋白質を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該蛋白質を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

【0058】

動物個体を用いて本発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば公知の方法 [Am. J. Clin. Nutr., 63, 639S (1996)、Am. J. Clin. Nutr., 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)]に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に本発明の蛋白質を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、本発明の蛋白質をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該蛋白質を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモー

ター、βラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0059】

植物個体を用いて本発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば本発明の蛋白質をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法[組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends Biotechnol., 15, 45 (1997)]に準じて栽培し、該蛋白質を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を生産する方法があげられる。

【0060】

本発明の形質転換体により製造された蛋白質を単離・精製する方法としては、通常の酵素の単離、精製法を用いることができる。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

【0061】

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0062】

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該蛋白質を回収後、該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0063】

本発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。

即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【0064】

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をあげることができる。

また、本発明の蛋白質を他の蛋白質との融合蛋白質として生産し、融合した蛋白質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、特開平05-336963、特開平06-823021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

【0065】

また、本発明の蛋白質をFlagペプチドとの融合蛋白質として生産し、抗Flag抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]。更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

【0066】

上記で取得された蛋白質のアミノ酸情報を基に、Fmoc法(フルオレニルメ

チルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法により、本発明の蛋白質を製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

[3] ガラクトース含有糖質の調製

上記[2]の培養により得られた形質転換体の培養液および該培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中でガラクトース含有糖質を製造することができる。

【0067】

培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩碎処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品などをあげることができる。

【0068】

ガラクトース含有糖鎖の生成において用いられる酵素源は、37°Cで1分間に1 molのガラクトース含有糖質を生成することのできる活性を1単位(U)として、1 mU/l~1,000 U/lであり、好ましくは10 mU/l~100 U/lの濃度で用いる。

ガラクトース含有糖鎖の生成において用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

【0069】

ガラクトース含有糖質の生成において、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン(例えばナイミーンS-215、日本油脂社製)などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・プロマイドやアルキルジメチル・ベンジルア

ンモニウムクロライド（例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネットなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミンFB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、ガラクトース含有糖質の生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1～50 g/1の濃度で用いられる。有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常0.1～50 ml/1の濃度で用いられる。

【0070】

ガラクトース含有糖鎖の生成反応は水性媒体中、pH 5～10、好ましくはpH 6～8、20～50°Cの条件で1～96時間行う。該生成反応において、必要に応じてMnCl₂、MgCl₂等の無機塩等を添加することができる。

水性媒体中に生成したガラクトース含有糖鎖の定量はDionex社製の糖分析装置などを用いて行うことができる[Anal. Biochem., 189, 151 (1990)]。

【0071】

反応液中に生成したガラクトース含有糖鎖の採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法によって行うことができる。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0072】

【実施例】

実施例1 β 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子を含有するDNAの取得

[1] ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株からの夾膜多糖生合成遺伝子のクローニング (1)

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株をJ. Bacteriol., 181, 5176 (1999)記載の方法により培養した。遠心分離により菌体を取得した後、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法に従って、該微生物の染色体DNAを単離精製した。

【0073】

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type IIIの夾膜多糖生合成遺伝子であるcpsD遺伝子周辺の塩基配列[Mol. Microbiol., 8, 843 (1993)]に基づいて設計された配列番号4および5で表される塩基配列からなるDNAをパーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成機を用いて合成した。該合成DNAをプライマーセットとして用い、ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株の染色体DNAを鑄型としてPCRを行った。PCRは染色体DNA 0.1μg、プライマー各 0.5μmol/l、Takara LA Taqポリメラーゼ(宝酒造社製)2.5 units、Takara LA Taqポリメラーゼ用緩衝液 4μl、deoxyNTP各 200μmol/lを含む反応液 40μlを用い、94°Cで1分間、42°Cで2分間、72°Cで3分間の工程を30回繰り返すことにより行った。得られた増幅断片をランダムプライマーDNAラベリングキット(宝酒造社製)を用いてラベリングすることにより、プローブを調製した。

【0074】

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株の染色体DNAを制限酵素EcoRIにより処理した断片をpBluescriptII SK(+)に連結して組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換することによりライブラリーを作製した。

上記で調製したプローブおよびライブラリーを用いて、常法に従ってコロニーハイブリダイゼイションを行い、強いシグナルを示すクローン1株を取得した。この株の保有するプラスミドをpBA101と命名し、その構造を解析したところ、pBluescriptII SK(+)にストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株の染色体DNA由来の3.5kbの断片が挿入された構造であった。常法により該DNA断片の塩基配列を決定したところ、該DNA断片には、J. Bacteriol., 181, 5176 (1999)でcpsIaF、cpsIaGおよびcpsIaHと命名された3つの遺伝子とcpsIaEと命名された遺伝子の一部が見出され、該DNA断片は、夾膜多糖生合成遺伝子群の一部を含有するDNAであることが確認された。また、相同性検索の結果、cpsIaE遺伝子はグルコース転移酵素遺伝子、cpsIaG遺伝子はβ1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子と高い相同性を示すことが確認された(図1)。

[2] ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株からの夾膜多糖生合成遺伝子のクローニング(2)

実施例1の[1]で得られたプラスミドpBA101に挿入されているストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株由来の3.5kbの断片をランダムプライマーDNAラベリングキット(宝酒造社製)を用いてラベリングすることにより、プローブを調製した。

【0075】

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株の染色体DNAを制限酵素BglIにより処理した断片をpBluescriptII SK(+)に連結して組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換することによりライブラリーを作製した。

上記で調製したプローブおよびライブラリーを用いてコロニーハイブリダイゼイションを行い、強いシグナルを示すクローン1株を取得した。この株の保有するプラスミドをpBA103と命名し、その構造を解析したところ、pBluescriptII SK(+)にストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株の染色体DNA由来の3.1kbのDNA断片が挿入された構造であった。常法により該3.1kbのDNA断片の塩基配列を決定したところ、該DNA断片には、cpsIaI、cpsIaJと命名した遺伝子とcpsIaH遺伝子の一部が見出され、pBA103に保有されるDNA断片は、pBA101に保有されるDNA断片と染色体上で隣接しているDNAであることがわかり、pBA103もまた夾膜多糖生合成遺伝子群の一部のDNAを保有するプラスミドであることが判明した。また、相同性検索の結果、cpsIaI遺伝子は β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子、cpsIaJは β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子と高い相同性を示すことが確認された[図1、J. Bacteriol., 181, 5176 (1999)]。

[3] ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株からの β 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子を含有するDNAの取得

実施例1の[2]で得られたプラスミドpBA103に挿入されているストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株由来の3.1kbの断片をランダムプライマーDNAラベリングキット(宝酒造社製)を用いてラベリングすることにより、プローブを調製した。

【0076】

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株を、J. Bactriol., 181, 5176 (1999)記載の方法により培養した。遠心分離により菌体を取得した後、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法に従って、該微生物の染色体DNAを単離精製した。

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株の染色体DNAを制限酵素BglI Iにより処理した断片をpBluescriptII SK(+)に導入し、これを大腸菌JM109に形質転換することによりライブラリーを作製した。

【0077】

上記で調製したプローブおよびライブラリーを用いてコロニーハイブリダイゼイションを行い、強いシグナルを示すクローン2株を取得した。これらの株の保有するプラスミドをそれぞれpBB102およびpBB103と命名し、その構造を解析したところ、それぞれpBluescriptII SK(+)にストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株の染色体DNA由来の 5.5および 1.4kbの断片が挿入された構造であった（図1）。

【0078】

これら2つのDNA断片について、常法に従い塩基配列を決定したところ、該2つのDNA断片は染色体DNA上で隣接して存在しており、配列番号3で表される連続した塩基配列からなることが明らかとなった。配列番号3で表される塩基配列からなるDNAには、cpsIbE、cpsIbF、cpsIbG、cpsIbH、cpsIbI、およびcpsIbJと命名される遺伝子が存在することが判明した。相同性検索の結果、cpsIbE遺伝子はcpsIaE遺伝子およびグルコース転移酵素遺伝子、cpsIbG遺伝子はcpsIaG遺伝子および β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子、cpsIbI遺伝子はcpsIaI遺伝子および β 1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素遺伝子と相同性が高かったことから、配列番号3で表される塩基配列からなるDNAは、ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株の夾膜多糖生合成遺伝子群の一部を含有するDNAであることが確認された。

【0079】

また、配列番号2で表される塩基配列からなるcpsIbJ遺伝子にコードされる蛋白質は、糖転移酵素の保存配列を有するが、cpsIaJ遺伝子と相同性が低いこと、

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株における夾膜多糖生合成において cpsIaJ 遺伝子産物はガラクトースの転移を担っていること [J. Bactriol., 181, 5176 (1999)]、およびストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株とストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株では該ガラクトースの結合様式がそれぞれ β 1, 4 と β 1, 3 と異なっていること [J. Bactriol., 181, 5176 (1999)] から、cpsIbJ 遺伝子は β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をコードする DNA からなる遺伝子であると推定された。該 DNA にコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号 1 に示した。

実施例 2 β 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子発現株の造成

バーセプティブ・バイオシステムズ社製 8905 型 DNA 合成機を用いて合成した、配列番号 6 および 7 で表される塩基配列からなる DNA を用いて、実施例 1 の [3] で取得されたガラクトース転移酵素遺伝子を含む DNA 断片を、下記の方法で増幅した。

【0080】

上記合成 DNA をプライマーとして用い、ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib 株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。PCR は染色体 DNA 0.1 μ g、プライマー各 0.5 μ mol/l、Takara LA Taq ポリメラーゼ(宝酒造社製)2.5 units、Takara LA Taq ポリメラーゼ用緩衝液 4 μ l、deoxyNTP 各 200 μ mol/l を含む反応液 40 μ l を用い、94°C で 1 分間、42°C で 2 分間、72°C で 3 分間の工程を 30 回繰り返すことにより行った。

【0081】

該反応液の 1/10 量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液からジーンクリーン II キット(バイオ 101 社製)を用いて増幅断片を回収し、該 DNA の TE [10 mmol/l Tris-HCl、1 mmol/l EDTA (pH 8.0)] 溶液 20 μ l を得た。

該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 NotI および XbaI で切断し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した後、ジーンクリーン II キットにより 2.0 kb の DNA 断片を回収した。

【0082】

pBluescriptII SK(+) DNA 0.2 μ gを制限酵素 NotI および XhoI で切斷後、アガロースゲル電気泳動により DNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキットにより 3.0 kbのDNA断片を回収した。

該 2.0 kbおよび 3.0 kbの断片をライゲーションキットを用いて、16°Cで16時間、連結反応を行った。

【0083】

該連結反応液を用いて大腸菌JM109株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μ g/mlを含むLB寒天培地[バクトトリプトン(ディフコ社製) 10 g/l、酵母エキス(ディフコ社製) 10 g/l、塩化ナトリウム 5 g/l、寒天15g/l]に塗布後、37°Cで一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、発現プラスミドであるpBBPIJを得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(図2)。

【0084】

同様に、バーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成機を用いて合成した、配列番号7および8で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして用い、ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液からジーンクリーンIIキット(バイオ101社製)を用いて増幅断片を回収し、該DNAのTE溶解液 20 μ lを得た。

【0085】

該溶解液 5 μ lを用い、DNAを制限酵素 EcoI および XhoI で切斷し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットにより 1.0 kbのDNA断片を回収した。

pBluescriptII SK(+) DNA 0.2 μ gを制限酵素 EcoRI および XhoI で切斷後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキットを用いて 3.0 kbのDNA断片を回収した。

【0086】

該 1.0 kb および 3.0 kb の断片をライゲーションキットを用いて、16°C で 16 時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いて大腸菌 JM109 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μg/ml を含む LB 培地に塗布後、37°C で一晩培養した。

【0087】

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、発現プラスミドである pBBPJ を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（図 2）。

ストレプトコッカス・アガラクチエ type Ib 由来の β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をコードする DNA を含有するプラスミド pBBPJ を保有する大腸菌 Escherichia coli JM109/pBBPJ は、平成 12 年 12 月 21 日付で、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に FERM BP-7400 として寄託されている。

実施例 3 ラクトーN-テトラオースの生産

実施例 2 で得られた Escherichia coli JM109/pBBPIJ 株および JM109/pBBPJ 株をそれぞれアンピシリン 50 μg/ml を含む LB 培地 8 ml の入った大型試験管に接種し 37°C で 17 時間培養した。該培養液をアンピシリン 50 μg/ml を含む LB 培地 8 ml の入った大型試験管に 1% 接種し 37°C で 5 時間培養後、1 mmol/l となるように IPTG を添加した。さらに 2 時間培養した後、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体から公知の方法 [J. Biol. Chem., 272, 19502 (1997)、Mol. Microbiol., 26, 197 (1997)] に従って膜画分を調製した。該膜画分は必要に応じて -80°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0088】

受容体糖質となるラクトーN-トリオース II は、ラクトーN-ネオテトラオース（シグマ社製）に β -ガラクトシダーゼ（生化学工業社製）を作用させ、非還元末端のガラクトースを完全に除去した後、100°C で 5 分間熱処理することにより β -ガラクトシダーゼ活性を失活させることにより調製した。

JM109/pBBPIJ 株膜画分 (200 μg/ml)、50 mmol/l クエン酸バッファー (pH 7.0)

、5 mmol/l MnCl₂、10 mmol/l ラクトーN-トリオースII、5 mmol/l UDP-ガラクトースからなる0.1 mlの反応液中で、37°Cで72時間反応を行った。

【0089】

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて以下の分析条件で分析し、反応液中に0.2 mmol/lのラクトーN-テトラオースが生成蓄積していることを確認した。

同様にJM109/pBBPJ株の膜画分を用いた場合には、0.05 mmol/lのラクトーN-テトラオースが生成蓄積していることが確認できた。

分析条件：

カラム：CarboPAC PA10

溶離液：A；H₂O、B；500 mmol/l NaOH

グラジエント：10-70% B in 20 min

検出器：パルスドアンペロメトリー検出器

【0090】

【発明の効果】

本発明により、N-アセチルグルコサミンに β 1, 3結合でガラクトースを転移する活性を有する微生物由来の β 1, 3-ガラクトース転移酵素が提供される。該酵素を用いることにより効率的にガラクトース含有糖質を製造できる。

【0091】

【配列表フリーテキスト】

配列番号4：合成DNA

配列番号5：合成DNA

配列番号6：合成DNA

配列番号7：合成DNA

配列番号8：合成DNA

【0092】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Beta 1,3-galactosyltransferase and a DNA coding for said enzyme

<130> H12-2111A4

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211>

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae Type Ib

<400> 1

Met Asn Tyr Ser Ile Ile Met Ser Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asn Tyr

1

5

10

15

Val Arg Asp Ser Val Glu Ser Ile Leu Asn Gln Thr Leu Thr Asp Phe

20

25

30

Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Asn Pro Ser Arg Gly Asp Leu Lys Gln

35 40 45

Phe Leu Thr Glu Tyr Ser Val Val Asp Asn Arg Ile Lys Ile Leu Leu

50 55 60

Asn Glu Glu Asn Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Asn Lys Ala Val Lys

65 70 75 80

Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Ile Phe Arg Met Asp Ala Asp Asp Ile Ser

85 90 95

Tyr Pro Ser Arg Phe Asp Lys Gln Ile Arg Phe Met Glu Glu Asn Ser

100 105 110

Leu Asp Phe Ser Ala Thr Leu Ile Glu Leu Ile Asp Gln Lys Gly Asn

115 120 125

Leu Val Tyr Lys Gln Arg Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asn Asp

130 135 140

Ile Arg Lys Met Leu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Ala His Pro Thr Trp

145 150 155 160

Cys Val Lys Lys Val Phe Asp Lys Leu Met Gly Tyr Arg Asp Leu

165 170 175

Val Pro Val Glu Asp Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Gly Ala Leu Ala Asp

180 185 190

Phe Lys Ile Gly Leu Leu Asn Lys Val Leu Leu Gln Tyr Arg Leu Asn

195

200

205

Glu Asn Gly Ile Ser Gln Thr Asn Lys Phe Lys Gln Tyr Ile Tyr Ser

210

215

220

Ala Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Lys Glu Lys Ser Tyr Ile Asp Ile Thr

225

230

235

240

Lys Ile Thr Asn Tyr Phe Gln Glu Tyr Val Ile Lys Lys Arg Tyr Thr

245

250

255

Gln Gln Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Ser Thr Pro Ser Ile

260

265

270

Thr Ile Arg Lys Leu Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Tyr Phe Lys Ser Pro

275

280

285

Leu Val Arg Arg Leu Leu Ile Asn Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu Lys

290

295

300

Leu Phe Gly Gly Glu Lys Gln Ser Asp

305

310

313

<210> 2

<211>

<212> DNA

<213> Streptococcus agalactiae Type Ib

<400> 2

atg aat tat agt atc att atg tcg gta tat aat gag cct tta aat tat 48
Met Asn Tyr Ser Ile Ile Met Ser Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asn Tyr
1 5 10 15

gtg aga gat tca gta gaa tct ata tta aat caa acg ctt act gat ttt 96
Val Arg Asp Ser Val Glu Ser Ile Leu Asn Gln Thr Leu Thr Asp Phe
20 25 30

gag ttc ata att gtc att gat aat cca agt aga ggt gat tta aag caa 144
Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Asn Pro Ser Arg Gly Asp Leu Lys Gln
35 40 45

ttc tta aca gaa tat tca gtt gta gat aat aga ata aaa atc ttg ctt 192
Phe Leu Thr Glu Tyr Ser Val Val Asp Asn Arg Ile Lys Ile Leu Leu
50 55 60

aat gaa gaa aat att ggt tta gca tca agt ttg aac aaa gcg gtg aaa 240
Asn Glu Glu Asn Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Asn Lys Ala Val Lys
65 70 75 80

att tct aag gga gaa tat att ttt aga atg gat gct gat gat att tca 288
Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Ile Phe Arg Met Asp Ala Asp Asp Ile Ser
85 90 95

tat cca agt aga ttt gat aag caa att cgt ttt atg gag gaa aat tca 336
Tyr Pro Ser Arg Phe Asp Lys Gln Ile Arg Phe Met Glu Glu Asn Ser
100 105 110

ttg gat ttc tca gca act cta ata gaa ttg ata gac caa aaa gga aat 384

Leu Asp Phe Ser Ala Thr Leu Ile Glu Leu Ile Asp Gln Lys Gly Asn

115

120

125

tta gta tat aaa caa cga gaa agt aat aaa ata tac tta act aat gat 432

Leu Val Tyr Lys Gln Arg Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asn Asp

130

135

140

ata cgg aag atg tta ttg aat aga tct ata ctt gcc cac cca acg tgg 480

Ile Arg Lys Met Leu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Ala His Pro Thr Trp

145

150

155

160

tgc gta aaa aag aaa gtt ttc gat aag tta atg gga tat aga gat tta 528

Cys Val Lys Lys Val Phe Asp Lys Leu Met Gly Tyr Arg Asp Leu

165

170

175

gta cct gtt gaa gat tat gat ttt gca ata aga gga gct ctg gct gat 576

Val Pro Val Glu Asp Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Gly Ala Leu Ala Asp

180

185

190

ttc aaa atc ggc tta ctc aat aaa gta ctt tta cag tat aga tta aac 624

Phe Lys Ile Gly Leu Leu Asn Lys Val Leu Leu Gln Tyr Arg Leu Asn

195

200

205

gag aat gga ata tca caa acc aat aag ttt aag caa tat att tac tca 672

Glu Asn Gly Ile Ser Gln Thr Asn Lys Phe Lys Gln Tyr Ile Tyr Ser

210

215

220

gct att tta caa gat ttt tat aaa gaa aaa tct tat att gat atc aca 720

Ala Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Lys Glu Lys Ser Tyr Ile Asp Ile Thr

225 230 235 240

aaa att act aat tac ttt caa gag tat gtg ata aag aaa cgc tat act 768

Lys Ile Thr Asn Tyr Phe Gln Glu Tyr Val Ile Lys Lys Arg Tyr Thr

245 250 255

cag caa gag ctc tct aaa tat ttt gag cta aaa tct acc cct agt att 816

Gln Gln Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Ser Thr Pro Ser Ile

260 265 270

act att aga aaa cta tat att tgt tta tat tta tac ttt aag tct ccc 864

Thr Ile Arg Lys Leu Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Tyr Phe Lys Ser Pro

275 280 285

ttg gtt agg agg tta tta ata aat gat att aat att tta gta ctg aaa 912

Leu Val Arg Arg Leu Leu Ile Asn Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu Lys

290 295 300

ttg ttt gga gga gag aaa caa agt gac 939

Leu Phe Gly Gly Glu Lys Gln Ser Asp

305 310

<210> 3

<211> 6865

<212> DNA

<213> Streptococcus agalactiae Type Ib

<220>

<221> CDS

<222> (617)..(1789)

<220>

<221> CDS

<222> (1816)..(2262)

<220>

<221> CDS

<222> (2265)..(2744)

<220>

<221> CDS

<222> (2843)..(3979)

<220>

<221> CDS

<222> (3982)..(4953)

<220>

<221> CDS

<222> (5009)..(5947)

<400> 3

agatcttgga gatattatct gtgaaaccaa tggatggatcg ttcccttcagg 60

gaaagtacca ccaaataccaa cagcattact tcagaacgct tattttata agatgattga 120

agctattaaa aatatatttg attatattat catcgatact ccacctattg gtttagttgt 180

tgatgccgca ataatcgcta atgcttcgca tggtttatt ttagtaaccc aagcaggttag 240

aataaaacgt aattatgttggaaaagcaaa agaacagatg gaacaaagtggttcaaagtt 300

cttaggtatt attcttaata aagttaatga atctgttgct acttacggcg attatggaaa 360

ttacggaaaa agggatagaa aaaggaagta aggggctttgttatttttttctgcaagttt 420

tatacaaaag attattatag cgatgattca aaccgttggatgttatttttctgcaagttt 480

gacattaaca ttaattactc ccaactttaa aagcaataaa gatttatttttggatgttctattt 540

gatacattat attgtctttt atctttctga tttttacaga gacttttgga gtcgtggcta 600

tcttgaagag tttaaa atg gta ttg aaa tac agc ttt tac tat att ttc ata 652

Met Val Leu Lys Tyr Ser Phe Tyr Tyr Ile Phe Ile

1

5

10

tca agt tca tta ttt ttt att tct aaa aac tct ttt aca acg aca cga 700

Ser Ser Ser Leu Phe Phe Ile Ser Lys Asn Ser Phe Thr Thr Thr Arg

15

20

25

ctt tcc ttt ttt act ttt att gct atg aat tcg att tta tta tat cta 748

Leu Ser Phe Phe Thr Phe Ile Ala Met Asn Ser Ile Leu Leu Tyr Leu

30

35

40

ttg aat tca ttt tta aaa tat tat cga aaa tat tct tac gct aag ttt 796

Leu Asn Ser Phe Leu Lys Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ser Tyr Ala Lys Phe

45

50

55

60

tca cga gat acc aaa gtt gtt ttg ata acg aat aag gat tct tta tca 844

Ser Arg Asp Thr Lys Val Val Leu Ile Thr Asn Lys Asp Ser Leu Ser

65

70

75

aaa atg acc ttt agg aat aaa tac gac cat aat tat atc gct gtc tgt 892

Lys Met Thr Phe Arg Asn Lys Tyr Asp His Asn Tyr Ile Ala Val Cys

80

85

90

atc ttg gat tcc tct gaa aag gat tgt tat gat ttg aaa cat aac tcg 940

Ile Leu Asp Ser Ser Glu Lys Asp Cys Tyr Asp Leu Lys His Asn Ser

95

100

105

tta agg ata ata aac aaa gat gct ctt act tca gag tta acc tgc tta 988

Leu Arg Ile Ile Asn Lys Asp Ala Leu Thr Ser Glu Leu Thr Cys Leu

110

115

120

act gtt gat caa gct ttt att aac ata ccc att gaa tta ttt ggt aaa 1036

Thr Val Asp Gln Ala Phe Ile Asn Ile Pro Ile Glu Leu Phe Gly Lys

125

130

135

140

tac caa ata caa gat att att aat gac att gaa gca atg gga gtg att 1084

Tyr Gln Ile Gln Asp Ile Ile Asn Asp Ile Glu Ala Met Gly Val Ile

145

150

155

gtc aat gtt aat gta gag gca ctt agc ttt gat aat ata gga gaa aag 1132

Val Asn Val Asn Val Glu Ala Leu Ser Phe Asp Asn Ile Gly Glu Lys

160

165

170

cga atc caa act ttt gaa gga tat agt gtt att aca tat tct atg aaa 1180

Arg Ile Gln Thr Phe Glu Gly Tyr Ser Val Ile Thr Tyr Ser Met Lys

175

180

185

ttc tat aaa tat agt cac ctt ata gca aaa cga ttt ttg gat atc atg 1228

Phe Tyr Lys Tyr Ser His Leu Ile Ala Lys Arg Phe Leu Asp Ile Met

190

195

200

ggg gct att ata ggt ttg ctc ata tgt ggc att gtg gca att ttt cta 1276

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Leu Ile Cys Gly Ile Val Ala Ile Phe Leu

205

210

215

220

gtt ccg caa atc aga aaa gat ggt gga ccg gct atc ttt tct caa aat 1324

Val Pro Gln Ile Arg Lys Asp Gly Gly Pro Ala Ile Phe Ser Gln Asn

225

230

235

aga gta ggt cgt aat ggt agg att ttt aga ttc tat aaa ttc aga tca 1372

Arg Val Gly Arg Asn Gly Arg Ile Phe Arg Phe Tyr Lys Phe Arg Ser

240

245

250

atg cga gta gat gca gaa caa att aag aaa gat tta tta gtt cac aat 1420

Met Arg Val Asp Ala Glu Gln Ile Lys Lys Asp Leu Leu Val His Asn

255

260

265

caa atg acg ggg cta atg ttt aag tta gac gat gat cct aga att act 1468

Gln Met Thr Gly Leu Met Phe Lys Leu Asp Asp Asp Pro Arg Ile Thr

270

275

280

aaa ata gga aaa ttt att cga aaa aca agc ata gat gag ttg cct caa 1516
Lys Ile Gly Lys Phe Ile Arg Lys Thr Ser Ile Asp Glu Leu Pro Gln
285 290 295 300

ttc tat aat gtt tta aaa ggt gat atg agt tta gta gga aca cgc cct 1564
Phe Tyr Asn Val Leu Lys Gly Asp Met Ser Leu Val Gly Thr Arg Pro
305 310 315

ccc aca gtt gat gaa tat gaa aag tat aat tca acg cag aag cga cgc 1612
Pro Thr Val Asp Glu Tyr Glu Lys Tyr Asn Ser Thr Gln Lys Arg Arg
320 325 330

ctt agt ttt aag cca gga atc act ggt ttg tgg caa ata tct ggt aga 1660
Leu Ser Phe Lys Pro Gly Ile Thr Gly Leu Trp Gln Ile Ser Gly Arg
335 340 345

aat aat att act gat ttt gat gaa atc gta aag tta gat gtt caa tat 1708
Asn Asn Ile Thr Asp Phe Asp Glu Ile Val Lys Leu Asp Val Gln Tyr
350 355 360

atc aat gaa tgg tct att tgg tca gat att aag att att ctc cta acg 1756
Ile Asn Glu Trp Ser Ile Trp Ser Asp Ile Lys Ile Ile Leu Leu Thr
365 370 375 380

cta aag gta gtt tta ctc ggg aca gga gct aag taaaggtaag gtttcaaagg 1809
Leu Lys Val Val Leu Leu Gly Thr Gly Ala Lys
385 390

aatata atg aaa att tgt ctg gtt ggt tca agt ggt ggt cac cta gca 1857

Met Lys Ile Cys Leu Val Gly Ser Ser Gly Gly His Leu Ala

395

400

405

cac ttg aac ctt ttg aaa ccc att tgg gaa aaa gaa gat agg ttt tgg 1905

His Leu Asn Leu Leu Lys Pro Ile Trp Glu Lys Glu Asp Arg Phe Trp

410

415

420

gta act ttt gat aaa gaa gat gct agg agt att cta aga gaa gag att 1953

Val Thr Phe Asp Lys Glu Asp Ala Arg Ser Ile Leu Arg Glu Glu Ile

425

430

435

gta tat cat tgc ttc ttt cca aca aac cgt aat gtc aaa aac ttg gta 2001

Val Tyr His Cys Phe Phe Pro Thr Asn Arg Asn Val Lys Asn Leu Val

440

445

450

aaa aat act att cta gct ttt aag gtc ctt aga aaa gaa aga cca gat 2049

Lys Asn Thr Ile Leu Ala Phe Lys Val Leu Arg Lys Glu Arg Pro Asp

455

460

465

gtt atc ata tca tct ggt gcc gct gta gca gta cca ttc ttt tat att 2097

Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Ala Val Ala Val Pro Phe Phe Tyr Ile

470

475

480

485

ggt aag tta ttt ggc tgt aag acc gtt tat ata gag gtt ttc gac agg 2145

Gly Lys Leu Phe Gly Cys Lys Thr Val Tyr Ile Glu Val Phe Asp Arg

490

495

500

提出日 平成13年 1月 5日
頁: 43/ 57

整理番号=H 1 2 - 2 1 1 A 4

ata gat aaa cca act ttg aca gga aaa tta gtg tat cct gta aca gat 2193
Ile Asp Lys Pro Thr Leu Thr Gly Lys Leu Val Tyr Pro Val Thr Asp
505 510 515

aaa ttt att gtt cag tgg gaa gaa atg aaa aaa gtt tat cct aag gca 2241
Lys Phe Ile Val Gln Trp Glu Glu Met Lys Lys Val Tyr Pro Lys Ala
520 525 530

att aat tta gga gga att ttt ta atg att ttt gtc aca gta ggg aca 2288
Ile Asn Leu Gly Gly Ile Phe Met Ile Phe Val Thr Val Gly Thr
535 540 545

cat gaa cag cag ttc aac cgt ctt att aaa gaa gtt gat aga tta aaa 2336
His Glu Gln Gln Phe Asn Arg Leu Ile Lys Glu Val Asp Arg Leu Lys
550 555 560

ggg aca ggt gct att gat caa gaa gtg ttc att caa acg ggt tac tca 2384
Gly Thr Gly Ala Ile Asp Gln Glu Val Phe Ile Gln Thr Gly Tyr Ser
565 570 575 580

gac ttt gaa cct cag aat tgt cag tgg tca aaa ttt ctc tca tat gat 2432
Asp Phe Glu Pro Gln Asn Cys Gln Trp Ser Lys Phe Leu Ser Tyr Asp
585 590 595

gat atg aac tct tac atg aaa gaa gct gag att gtt atc aca cac ggc 2480
Asp Met Asn Ser Tyr Met Lys Glu Ala Glu Ile Val Ile Thr His Gly
600 605 610

ggt cca gca acg ttt atg aat gca gtt tct aaa ggg aaa aaa act att 2528

Gly Pro Ala Thr Phe Met Asn Ala Val Ser Lys Gly Lys Lys Thr Ile

615 620

625

gtg gtt cct aga caa gaa cag ttt gga gag cat gtg aat aat cat cag 2576

Val Val Pro Arg Gln Glu Gln Phe Gly Glu His Val Asn Asn His Gln

630 635 640

gtg gat ttt ttg aaa gag tta ttc ttg aaa tat gag tta gat tat att 2624

Val Asp Phe Leu Lys Glu Leu Phe Leu Lys Tyr Glu Leu Asp Tyr Ile

645 650 655 660

ttg aat atc agt gaa tta gag aat att att aag gaa aaa aat ata tct 2672

Leu Asn Ile Ser Glu Leu Glu Asn Ile Ile Lys Glu Lys Asn Ile Ser

665 670 675

act agt aaa gta ata tca caa aac aat gat ttt tgt tcc tct ttc aaa 2720

Thr Ser Lys Val Ile Ser Gln Asn Asn Asp Phe Cys Ser Ser Phe Lys

680 685 690

aat gaa ctt tct aaa cta ttt gaa taaatatatt ttgttggaga aaaaaattga 2774

Asn Glu Leu Ser Lys Leu Phe Glu

695 700

aattaaactat caatccaaag tatttgttaa taggaggaat ttgcgttta accctattt 2834

caaagcca atg caa ctt ttg tta ctt tta gca tta ata gtt tta ctt att 2884

Met Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ile Val Leu Leu Ile

705 710

tgt agt agt tat aat gaa aaa atg aaa ttt tta aat atg gct gaa att 2932

Cys Ser Ser Tyr Asn Glu Lys Met Lys Phe Leu Asn Met Ala Glu Ile

715 720 725 730

ttt ttc att gta ttt tat atg gtt tat tta gta tca ata gta tta aat 2980

Phe Phe Ile Val Phe Tyr Met Val Tyr Leu Val Ser Ile Val Leu Asn

735 740 745

tcg tta ttt aga agt cca gaa ttt cat aga gtc att gct gca ttc aat 3028

Ser Leu Phe Arg Ser Pro Glu Phe His Arg Val Ile Ala Ala Phe Asn

750 755 760

tca ctg gca gta ggg gtt gtg tcc tta tta ttt tac cat tac tat aag 3076

Ser Leu Ala Val Gly Val Val Ser Leu Leu Phe Tyr His Tyr Tyr Lys

765 770 775

aat act aat att gaa tta aca aaa ttg cta aaa tca ttt ttg ttt aat 3124

Asn Thr Asn Ile Glu Leu Thr Lys Leu Leu Lys Ser Phe Leu Phe Asn

780 785 790

gca att att ttg ttt tgt tta gga ttt cta tat tat tat gcc ata tat 3172

Ala Ile Ile Leu Phe Cys Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Tyr Ala Ile Tyr

795 800 805 810

ttt gat gta gag aat gta agt ctt ttt gga aga aat tta att gga tca 3220

Phe Asp Val Glu Asn Val Ser Leu Phe Gly Arg Asn Leu Ile Gly Ser

815 820 825

gat tgg ata aat ggg atg cat acg cag aga gca atg gct ttc ttt gaa 3268

Asp Trp Ile Asn Gly Met His Thr Gln Arg Ala Met Ala Phe Phe Glu

830 835 840

tat tca aat ctt ata ata ccc tta act atc ata act aat ata tat ata 3316

Tyr Ser Asn Leu Ile Ile Pro Leu Thr Ile Ile Thr Asn Ile Tyr Ile

845 850 855

tat ata tat att aag caa aga tat agc tca ggg atg atg ata ctc ggt 3364

Tyr Ile Tyr Ile Lys Gln Arg Tyr Ser Ser Gly Met Met Ile Leu Gly

860 865 870

gct ctt ctc tcc act att ata cta ccc atc ggg tct gga tct aga gct 3412

Ala Leu Leu Ser Thr Ile Ile Leu Pro Ile Gly Ser Gly Ser Arg Ala

875 880 885 890

ggt att ata gtt gtg cta cta cag gtt ata att tta ttg ttg aat aca 3460

Gly Ile Ile Val Val Leu Leu Gln Val Ile Ile Leu Leu Leu Asn Thr

895 900 905

att gta ata aaa aga caa acg ata aga ttt ttc ctg tat tta gtt ccg 3508

Ile Val Ile Lys Arg Gln Thr Ile Arg Phe Phe Leu Tyr Leu Val Pro

910 915 920

ata cta ata tta cta tta gtg ata tta cgt ttt gat aat ttg gtg agc 3556

Ile Leu Ile Leu Leu Val Ile Leu Arg Phe Asp Asn Leu Val Ser

925 930 935

ata tat aat aga ata atc aat ttg cgg tcg gga agt agt gaa tct aga 3604

Ile Tyr Asn Arg Ile Ile Asn Leu Arg Ser Gly Ser Ser Glu Ser Arg

940

945

950

ttt tct ttg tac aag gat acc gta cac tca gta att act gac tca cta 3652

Phe Ser Leu Tyr Lys Asp Thr Val His Ser Val Ile Thr Asp Ser Leu

955 960 965 970

ttt ctg gga aaa ggt gta aaa gaa ttg tgg tta aat agt gat tta cca 3700

Phe Leu Gly Lys Gly Val Lys Glu Leu Trp Leu Asn Ser Asp Leu Pro

975

980

985

cta gga tcg cat tcg acc tac ata ggt tat ttc tat aaa act ggc cta 3748

Leu Gly Ser His Ser Thr Tyr Ile Gly Tyr Phe Tyr Lys Thr Gly Leu

990

995

1000

ttt gga cta ata aat gtg att tta ggt ttg ttt cta att ctt att agc 3796

Phe Gly Leu Ile Asn Val Ile Leu Gly Leu Phe Leu Ile Leu Ile Ser

1005

1010

1015

att atc aag gaa gct aaa aag tca gat ttc tat tat gag ata gta ggg 3844

Ile Ile Lys Glu Ala Lys Lys Ser Asp Phe Tyr Tyr Glu Ile Val Gly

1020

1025

1030

tct gtc ata ctc cta ttt tca ttt ttt gca ctt gaa gat att gat ggc 3892

Ser Val Ile Leu Leu Phe Ser Phe Phe Ala Leu Glu Asp Ile Asp Gly

1035 1040 1045 1050

gcc aat tgg ctc att att ttt gtc ttt aca gtg ttg gga att tta gaa 3940

Ala Asn Trp Leu Ile Ile Phe Val Phe Thr Val Leu Gly Ile Leu Glu

1055

1060

1065

aat aag gat ttc tat agt caa ctt aaa agg tgg gaa agt ta atg gaa 3987

Asn Lys Asp Phe Tyr Ser Gln Leu Lys Arg Trp Glu Ser Met Glu

1070

1075

1080

aaa caa ata ctt gtt tct atc gtt ata cct ata tac aac tcg gaa gca 4035

Lys Gln Ile Leu Val Ser Ile Val Ile Pro Ile Tyr Asn Ser Glu Ala

1085

1090

1095

tat ctt aaa gaa tgc gtg caa tcc gtc cta caa cag act cat tca ttg 4083

Tyr Leu Lys Glu Cys Val Gln Ser Val Leu Gln Gln Thr His Ser Leu

1100

1105

1110

ata gaa gtt ata ctg att aat gat gga tcc act gat aat agt gga gaa 4131

Ile Glu Val Ile Leu Ile Asn Asp Gly Ser Thr Asp Asn Ser Gly Glu

1115

1120

1125

att tgt gat aat tta tct caa aaa gac gat cgc ata ctt gta ttt cat 4179

Ile Cys Asp Asn Leu Ser Gln Lys Asp Asp Arg Ile Leu Val Phe His

1130

1135

1140

1145

aaa aaa aat gga ggg gta tct tcg gca agg aac cta ggt ctt gat aaa 4227

Lys Lys Asn Gly Gly Val Ser Ser Ala Arg Asn Leu Gly Leu Asp Lys

1150

1155

1160

tcc aca ggc gaa ttc ata acg ttt gta gat agt gat gat ttt gta gca 4275

Ser Thr Gly Glu Phe Ile Thr Phe Val Asp Ser Asp Asp Phe Val Ala

1165

1170

1175

ccg aat ata att gaa ata atg tta aaa aat tta atc act gag gat gct 4323

Pro Asn Ile Ile Glu Ile Met Leu Lys Asn Leu Ile Thr Glu Asp Ala

1180 1185 1190

gat ata gca gaa gta gat ttt gat att tcg aat gag aga gat tat aga 4371

Asp Ile Ala Glu Val Asp Phe Asp Ile Ser Asn Glu Arg Asp Tyr Arg

1195 1200 1205

aag aaa aaa aga cga aac ttt tat aag gtc ttt aaa aac aat aat tct 4419

Lys Lys Lys Arg Arg Asn Phe Tyr Lys Val Phe Lys Asn Asn Asn Ser

1210 1215 1220 1225

tta aaa gaa ttt tta tca ggt aat aga gtg gaa aat att gtt tgt aca 4467

Leu Lys Glu Phe Leu Ser Gly Asn Arg Val Glu Asn Ile Val Cys Thr

1230 1235 1240

aaa tta tat aaa aaa agt ata att ggt aac ttg agg ttt gat gag aat 4515

Lys Leu Tyr Lys Lys Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg Phe Asp Glu Asn

1245 1250 1255

tta aaa att ggt gag gat tta ctt ttt aat tgt aaa att tta tgt caa 4563

Leu Lys Ile Gly Glu Asp Leu Leu Phe Asn Cys Lys Ile Leu Cys Gln

1260 1265 1270

gag cac tgc ata gtc gta gat acg act tct tcc ttg tac acc tat cgc 4611

Glu His Cys Ile Val Val Asp Thr Thr Ser Ser Leu Tyr Thr Tyr Arg

1275 1280 1285

atc gta aag act tct gca atg aat cag gag ttc aac gaa aat tca tta 4659

Ile Val Lys Thr Ser Ala Met Asn Gln Glu Phe Asn Glu Asn Ser Leu
1290 1295 1300 1305

gat ttt ata aca att ttt aat gaa ata agc agt att gtt cct gca aaa 4707
Asp Phe Ile Thr Ile Phe Asn Glu Ile Ser Ser Ile Val Pro Ala Lys
1310 1315 1320

tta gct aat tat gtt gaa gcg aaa ttt tta aga gaa aag gta aag tgt 4755
Leu Ala Asn Tyr Val Glu Ala Lys Phe Leu Arg Glu Lys Val Lys Cys
1325 1330 1335

ctc cga aaa atg ttt gaa tta ggt agt aat att gac agt aaa atc aaa 4803
Leu Arg Lys Met Phe Glu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Ser Lys Ile Lys
1340 1345 1350

tta caa cga gag att ttt ttc aaa gat gtt aaa tta tac cct ttc tat 4851
Leu Gln Arg Glu Ile Phe Phe Lys Asp Val Lys Leu Tyr Pro Phe Tyr
1355 1360 1365

aaa gcg gtt aag tac tta tca tta aag gga tta ttg agt att tac tta 4899
Lys Ala Val Lys Tyr Leu Ser Leu Lys Gly Leu Leu Ser Ile Tyr Leu
1370 1375 1380 1385

atg aaa tgt tca ccc atc ttg tat ata aaa tta tat gac agg ttt caa 4947
Met Lys Cys Ser Pro Ile Leu Tyr Ile Lys Leu Tyr Asp Arg Phe Gln
1390 1395 1400

aaa cag taagtaatca aaaattaaat taactcaatt acctttaaa ttataggagt 5003
Lys Gln

tgaaa atg aat tat agt atc att atg tcg gta tat aat gag cct tta aat 5053

Met Asn Tyr Ser Ile Ile Met Ser Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asn

1405

1410

1415

tat gtg aga gat tca gta gaa tct ata tta aat caa acg ctt act gat 5101

Tyr Val Arg Asp Ser Val Glu Ser Ile Leu Asn Gln Thr Leu Thr Asp

1420

1425

1430

ttt gag ttc ata att gtc att gat aat cca agt aga ggt gat tta aag 5149

Phe Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Asn Pro Ser Arg Gly Asp Leu Lys

1435

1440

1445

1450

caa ttc tta aca gaa tat tca gtt gta gat aat aga ata aaa atc ttg 5197

Gln Phe Leu Thr Glu Tyr Ser Val Val Asp Asn Arg Ile Lys Ile Leu

1455

1460

1465

ctt aat gaa gaa aat att ggt tta gca tca agt ttg aac aaa gcg gtg 5245

Leu Asn Glu Glu Asn Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Asn Lys Ala Val

1470

1475

1480

aaa att tct aag gga gaa tat att ttt aga atg gat gct gat gat att 5293

Lys Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Ile Phe Arg Met Asp Ala Asp Asp Ile

1485

1490

1495

tca tat cca agt aga ttt gat aag caa att cgt ttt atg gag gaa aat 5341

Ser Tyr Pro Ser Arg Phe Asp Lys Gln Ile Arg Phe Met Glu Glu Asn

1500

1505

1510

提出日 平成13年1月5日
整理番号=H12-211A4 頁: 52/ 57

tca ttg gat ttc tca gca act cta ata gaa ttg ata gac caa aaa gga 5389

Ser Leu Asp Phe Ser Ala Thr Leu Ile Glu Leu Ile Asp Gln Lys Gly

1515 1520 1525 1530

aat tta gta tat aaa caa cga gaa agt aat aaa ata tac tta act aat 5437

Asn Leu Val Tyr Lys Gln Arg Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asn

1535 1540 1545

gat ata cgg aag atg tta ttg aat aga tct ata ctt gcc cac cca acg 5485

Asp Ile Arg Lys Met Leu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Ala His Pro Thr

1550 1555 1560

tgg tgc gta aaa aag aaa gtt ttc gat aag tta atg gga tat aga gat 5533

Trp Cys Val Lys Lys Val Phe Asp Lys Leu Met Gly Tyr Arg Asp

1565 1570 1575

tta gta cct gtt gaa gat tat gat ttt gca ata aga gga gct ctg gct 5581

Leu Val Pro Val Glu Asp Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Gly Ala Leu Ala

1580 1585 1590

gat ttc aaa atc ggc tta ctc aat aaa gta ctt tta cag tat aga tta 5629

Asp Phe Lys Ile Gly Leu Leu Asn Lys Val Leu Leu Gln Tyr Arg Leu

1595 1600 1605 1610

aac gag aat gga ata tca caa acc aat aag ttt aag caa tat att tac 5677

Asn Glu Asn Gly Ile Ser Gln Thr Asn Lys Phe Lys Gln Tyr Ile Tyr

1615 1620 1625

tca gct att tta caa gat ttt tat aaa gaa aaa tct tat att gat atc 5725

Ser Ala Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Lys Glu Lys Ser Tyr Ile Asp Ile

1630

1635

1640

aca aaa att act aat tac ttt caa gag tat gtg ata aag aaa cgc tat 5773

Thr Lys Ile Thr Asn Tyr Phe Gln Glu Tyr Val Ile Lys Lys Arg Tyr

1645

1650

1655

act cag caa gag ctc tct aaa tat ttt gag cta aaa tct acc cct agt 5821

Thr Gln Gln Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Ser Thr Pro Ser

1660

1665

1670

att act att aga aaa cta tat att tgt tta tat tta tac ttt aag tct 5869

Ile Thr Ile Arg Lys Leu Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Tyr Phe Lys Ser

1675

1680

1685

1690

ccc ttg gtt agg agg tta tta ata aat gat att aat att tta gta ctg 5917

Pro Leu Val Arg Arg Leu Leu Ile Asn Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu

1695

1700

1705

aaa ttg ttt gga gga gag aaa caa agt gac taatagaaaa atttatgtat 5967

Lys Leu Phe Gly Gly Glu Lys Gln Ser Asp

1710

1715

gtcatactct ttatcattta ttgattgtt tatataaaga agagatatat tcaaatttag 6027

aaattattct ctcttcttctt attcctgatg ttgataattt agagaaaaaa ttaaaatcaa 6087

aaacaataaa tatacatatt ttagaagaat ctagtggta aagtgaagaa ttattatcag 6147

tacttaaaga tgctggtcta agttatagta agtttgatag taattgttt attttaatg 6207

atgcaacgcc tattgggagg acactaataa agcatggat ttattataat ctaattgaag 6267

atggttaaa ttgtttact tactctatat ttagtcaaaa actttggaag tattatgtaa 6327

aaaaatataat tcttcacaaa attcagccac atggattttc acgatattgt ttagggattg 6387

aagtttaattc attagttaat ttgccaaagg atccgcgtta taaaaaattt attgaagtcc 6447

ctaggaaaga acttttgac aatgtacag aatatcaaaa agaaatggca ataaatctt 6507

ttggagcagt aagagttagt attaaatcac cttagtact agtattaacg cagcctctat 6567

ctatagataa agagttatg agtataaca ataagataga aacgtccgaa gaacaattt 6627

attttataa atcaatagtc aatgaatata taaataaagg gtacaatgtt tatttaaaag 6687

ttcatcctag agatgttagta gattattcca aattgccgtt agagctatta ccatcaaatg 6747

ttcctatgga aattatagag ttgatgttaa caggtcggtt cgaatgtggg ataacacatt 6807

cgtccactgc gctggatttt ttaacttgta ttgataaaaa aataacttta gtagatct 6865

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

ggggatcca atggattga aatacag

27

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

aatctgcaga cttagctcct gtcccgagt

29

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

ccaagcggcc gctatagtca acttaaaagg tgg

33

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

cggctcgagt cccaataggc gttgcata

28

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400>

ccggaattcg aaaaggtaaa gtgtctccga aa

32

【図面の簡単な説明】

【図1】ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株およびType Ib株の夾膜多糖生合成遺伝子の構造を示す。

【図2】 β 1, 3-ガラクトース転移酵素発現プラスミドpBBPIJおよびpBBPJの造成工程を示す。

【符号の説明】

整理番号 = H 1 2 - 2 1 1 A 4

提出日 平成 13 年 1 月 5 日
頁: 57/ 57

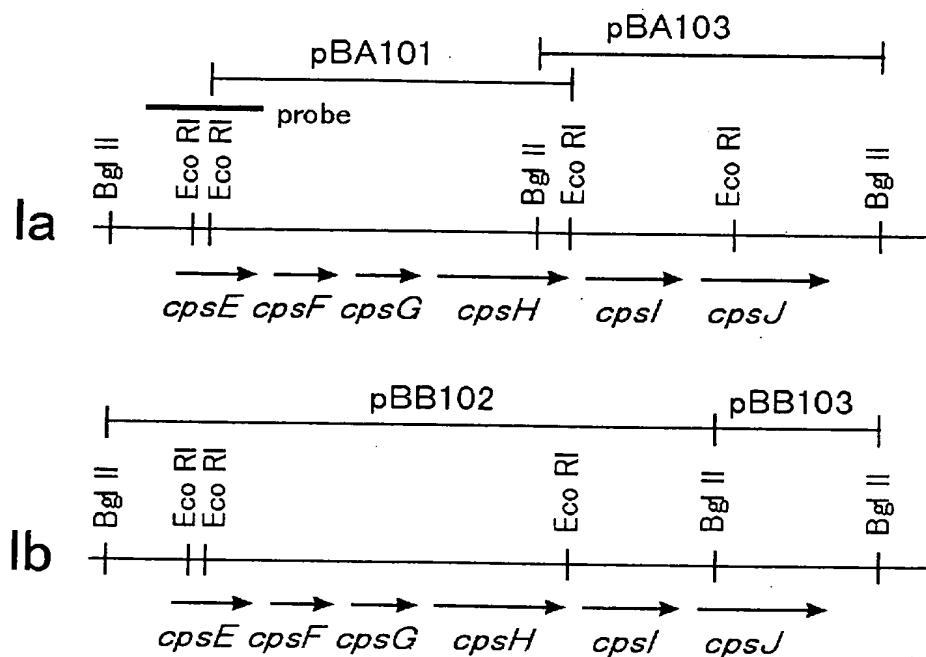
P_{lac} : lac プロモーター

cpsI : β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子

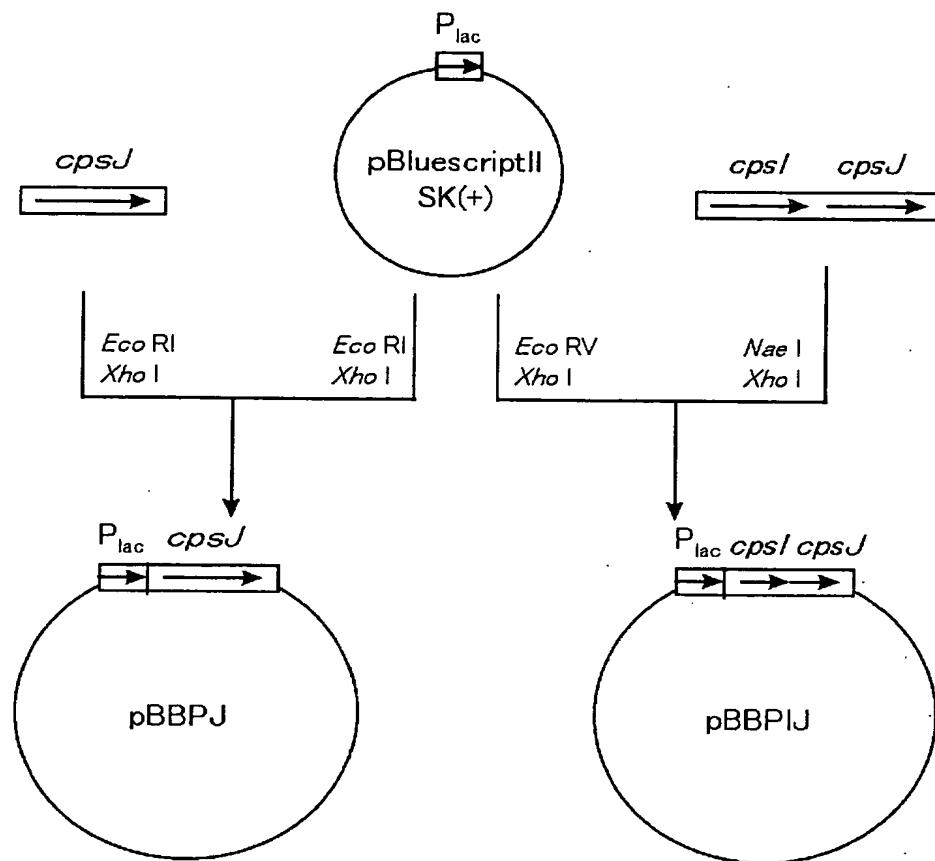
cpsJ : β 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを用いた β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質の製造法、および該蛋白質を用いたガラクトース含有糖鎖の製造法を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、 β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する新規蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを含有してなる組換えDNA、該組換えDNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体、該形質転換体を用いた上記蛋白質あるいはガラクトース含有糖鎖の製造法を提供することができる。

【選択図】 なし